

**MODULARIZACE VÝUKY EVOLUČNÍ A EKOLOGICKÉ BIOLOGIE**

CZ.1.07/2.2.00/15.0204



# **Metodologie molekulární fylogeneze a taxonomie hmyzu**

## **Bi7770**

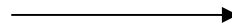
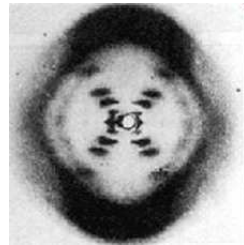
**Andrea Tóthová**



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

# Metodické přístupy stanovení primární struktury DNA

- Historie:



- **1953**: struktura DNA (James Watson a Francis Crick; *Nature*, NC 1962)
- **1964**: NC 1968 rozluštění genetického kódu (Nirenberg M. a Matthaei H.)
- **1977**: sekvenování chemickou degradací – neenzymatické štěpení DNA (Allan **Maxam** a Walter **Gilbert**, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*)
- **1977**: sekvenování terminátorovou metodou (Frederick **Sanger**, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*)
- **1985**: objev PCR (**Mullis**; NC, dr.h.c. LF MU)
  - Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., and Erlich H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology*. 51 Pt 1:263–373

- Aktuální stav:
  - **1996: sekvenování druhé generace** – pyrosekvenování (Nyrén P., Ronaghi M. ; Stockholm), 454 sekvenování Roche/454, Illumina Genome Analyzer Iix, Life Technologies SOLiD 4 a další
  - **21. století: sekvenování třetí generace** – SMRT (single molecule real-time) – 2008; 2013 (Pacific Biosciences)??, nanotechnologie, hmotnostní spektrometrie, konfokální laserové spektrometrie a další
- Výběr technologie závisí od plánovaného využití analýz

# MAXAM - GILBERTOVA METODA

- A. M. Maxam a W. Gilbert-1977
- Sekvence DNA je vystavena určitým chemikáliím, které nasekají vlákno ve specifických místech (nukleotidech)



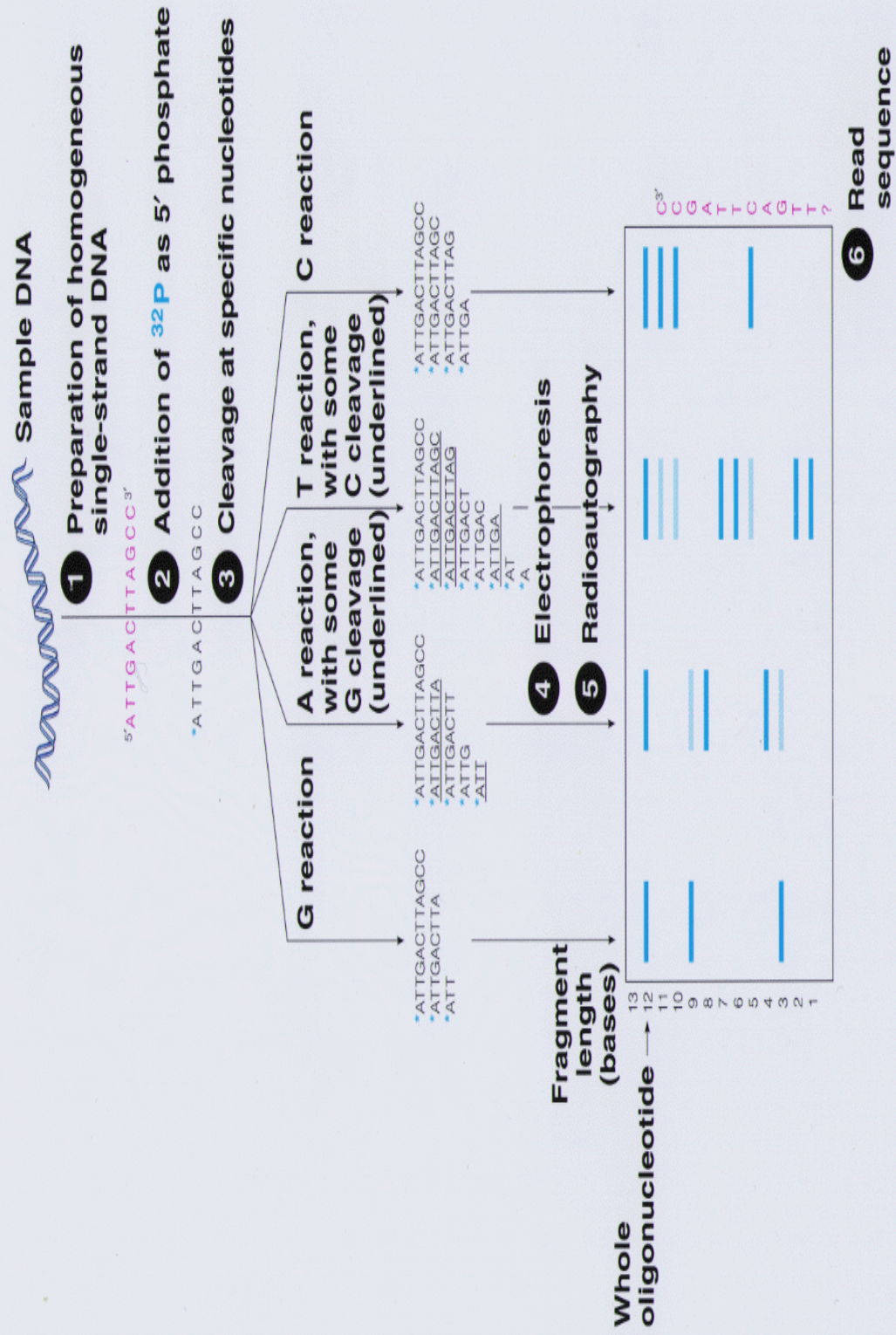
# Maxam-Gilbert

- ds DNA
- Radioaktivní značení 5'konce ds molekuly [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ] ATP (alkalická fosfatáza, polynukleotid kináza)
- Denaturace a separace vláken
- Chemická modifikace vlákna - metylace (G-dimetylsulfát, AT-kyselina mravenčí, CT-hydrazín, C-NaCl s hydrazínem)
- Selekční štěpení metylací piperidinem
- Elektroforéza
- Autoradiografie
- Vysoko radioaktivní látka, poločas rozpadu 14 dní, několik desítek bazí na gelu
- Dnes se již nepoužívá

**Table 10.1 Specific Base Reactions in Maxam-Gilbert Sequencing**

Chain breaks at:	Base Modifier	Reaction	Time (min at 25°C)
G	Dimethylsulphate	Methylates G	4
G + A	Formic acid	Protonates purines	5
T + C	Hydrazine	Splits pyrimidine rings	8
C	Hydrazine + salt	Splits only C rings	8

**Figure 4A.4 Sequencing an oligonucleotide by the Maxam-Gilbert method**





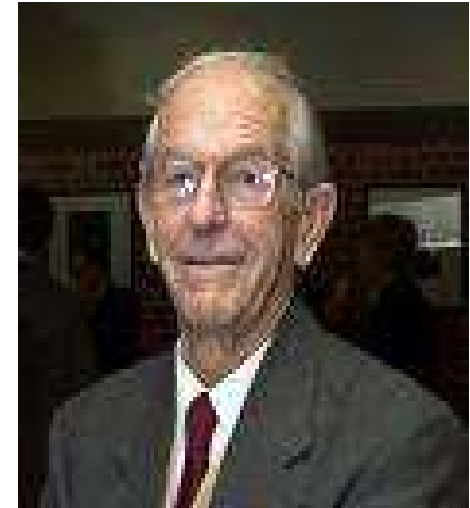
# Sanger – Coulson – (Nicklen)

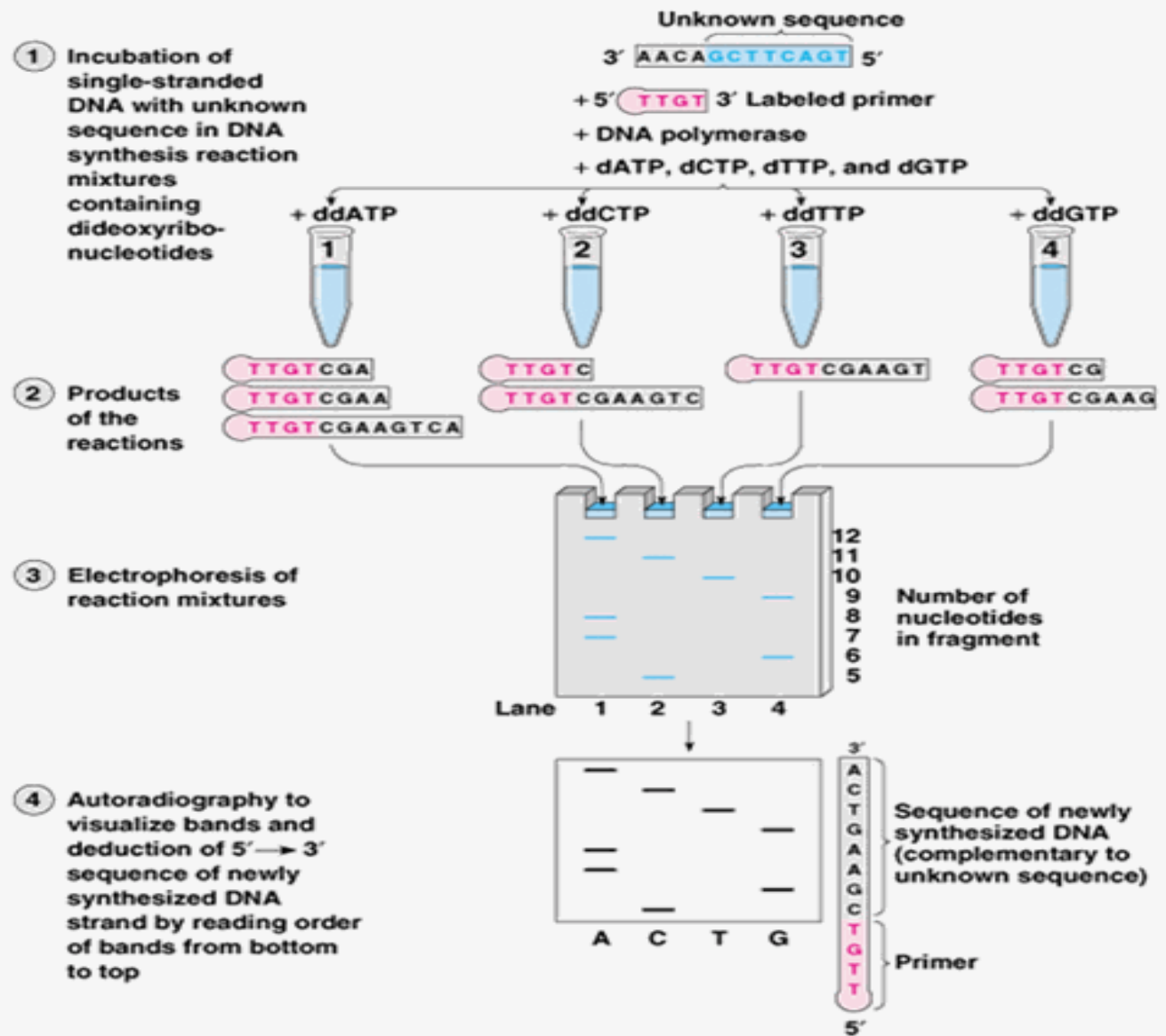
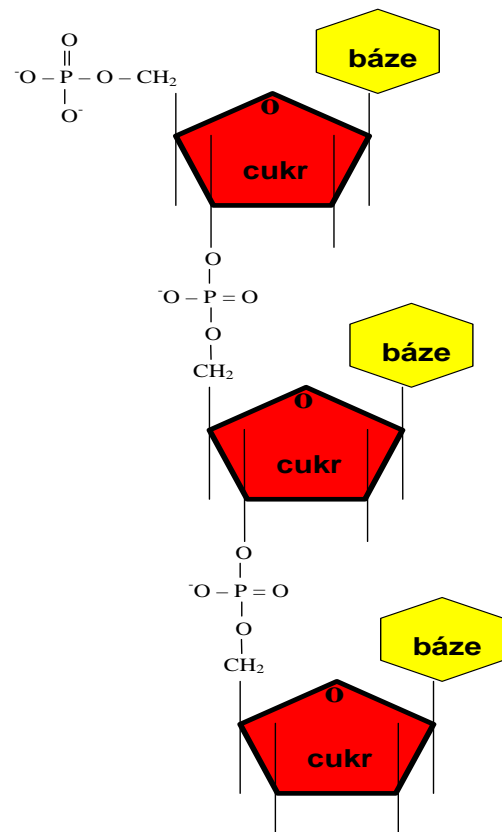
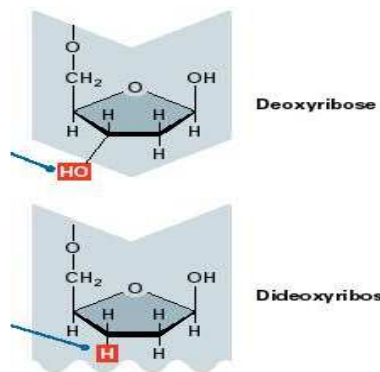
- Syntéza komplementárního vlákna z ss DNA templátu – restriční fragmenty (reakční pufr; dNTPs; DNA pol I – Klenowův fragment, T7 DNA pol, Taq DNA pol)
- Radioaktivní značení vznikající molekuly [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]dATP, [ $\alpha$ - $^{35}\text{S}$ ]dATP (alkalická fosfatáza, polynukleotid kináza)
- Složitá inkubace ve vícero krocích (annealing, amplifikace)
- Přidání terminátorů ddNTPs – postupná terminace (poměr dTTP:ddTTP)
- Nutnost terminace reakce (formaldehyd, chelatační činidla, barviva)
- Elektroforéza – 6-8% PAGE + TBE (TEMED, močovina, bis-akrylamid)
- Autoradiografie vysušeného gelu (24-48 hod) a následná detekce
- Radioaktivní látka, 30 nt od primeru – max 400 nt
- Prodloužení délky čteného vlákna
- Modifikace chemie (nahrazení radioaktivního značení)
- Modernizace metod analýzy syntetizovaných fragmentů, automatizace



# SANGEROVA metoda

- Nejpoužívanější způsob sekvenování
- Objeveno Frederickem Sangerem - 1977
- Nobelova cena - 1980





# Nahrazení radioaktivního značení fluorescenčními barvičkami

- Oligo – hybridizační sondy
- Radioaktivní nuklidy:  $^3\text{H}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{125}\text{I}$
- Detekce záření na scintilačním fotometru nebo autoradiografií na RTG filmu
- 3' i 5', celé fragmenty: DNA I pol, Klenowův fragment, T4 DNA pol, T4 polynukleotid kináza, alkalická fosfatáza (BAP, CIP)
- Fluorochromy – široké spektrum a využití v biologii
- 6-FAM, NED, PET, ROX, HEX, VIC, JOE, LIZ, BigDyes
- Detekce fluorescenčního záření: laser + indukční a emisní spektrum fluorochromu – excitace fluorochromu – detekce přes optický systém (CCD kamera; vzduchem chlazený CCD čip) – virtuální filtrování – vlnová délka se odečítá pouze v oblasti spektrálního maxima
- Ovlivnění mobility fragmentů

Radionuklid	Poločas rozpadu	Typ	Záření Max energie	Účinnost	
				voda	vzduch
$^{32}\text{P}$	14,3 dní	$\beta$	1,71 MeV	600 cm	7,8 mm
$^{35}\text{S}$	87,4 dní	$\beta$	0,167 MeV	26 cm	340 $\mu\text{m}$
$^{125}\text{I}$	60 dní	$\gamma$	0,35 MeV	1,5 cm	20 $\mu\text{m}$
$^3\text{H}$	12,43 roka	$\beta$	0,018 MeV	0,5 cm	5,5 $\mu\text{m}$

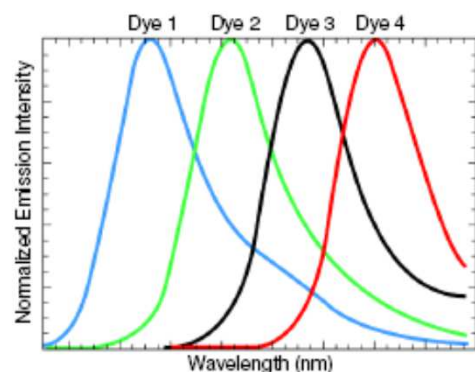


Figure 7 Emission spectra of the four BigDye dyes, where Dye 1 = Big-d110, Dye 2 = R6G, Dye 3 = Big-dTAMRA, and Dye 4 = Big-dROX

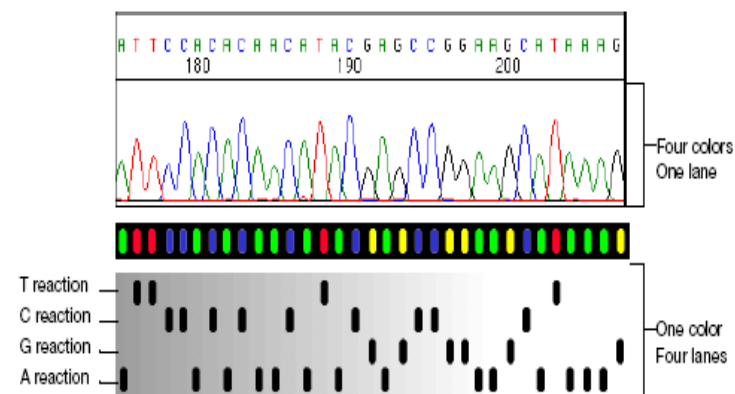
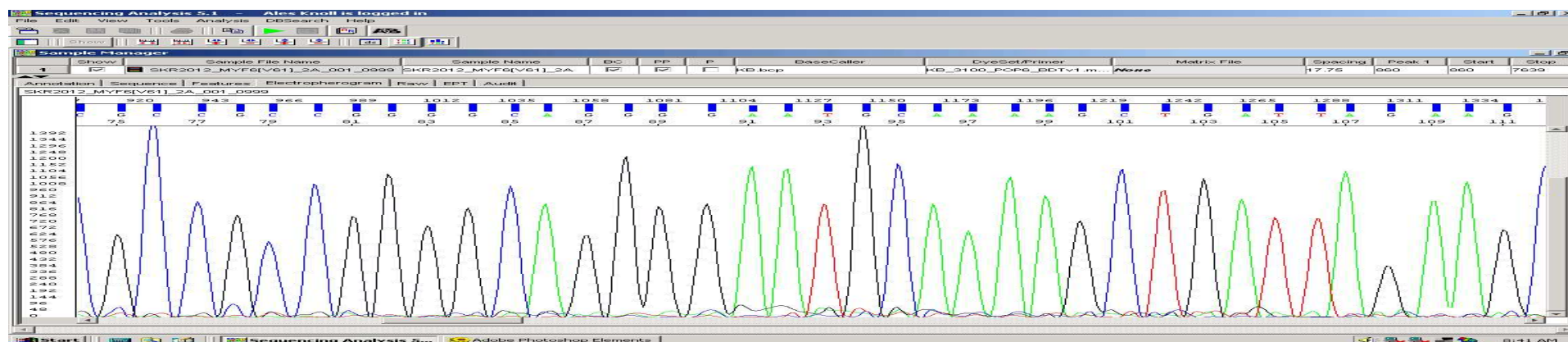


Figure 8 Fluorescent sequencing compared with radioactive sequencing



# 454- pyrosekvenování

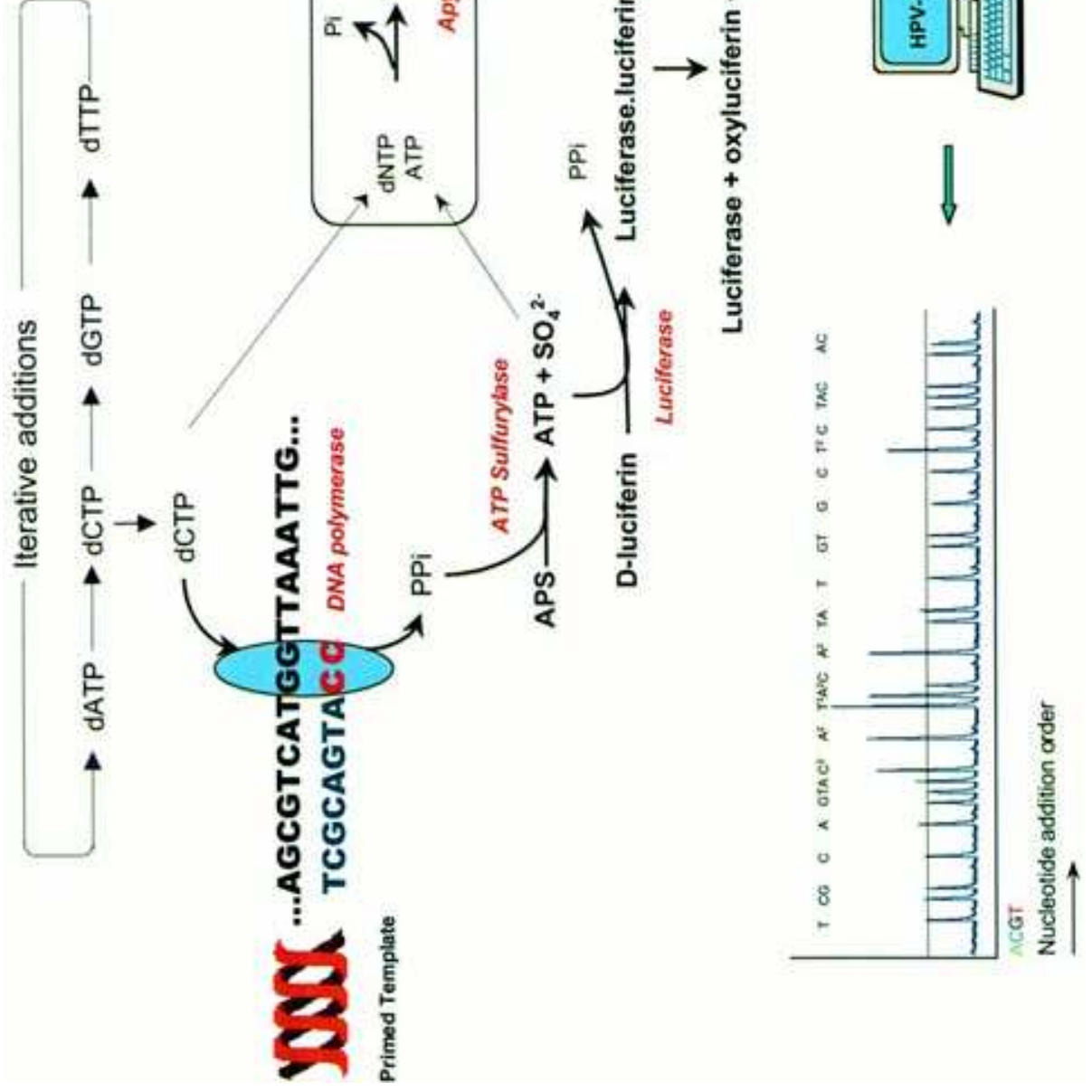
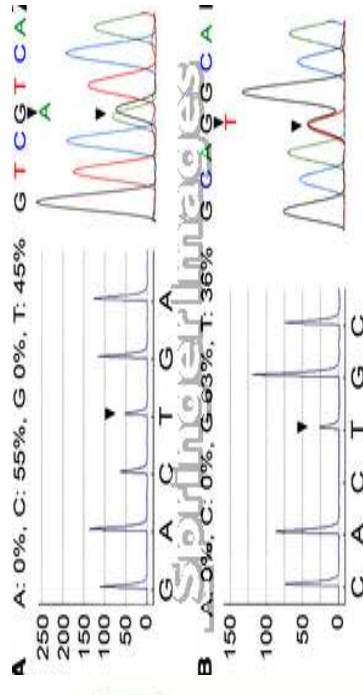
- 454 Life Sciences - komercializace
- Sekvenování druhé generace
- Celogenomové
- 4 enzymový systém
  - DNA polymeráza
  - ATP sulfuryláza
  - Luciferáza
  - Apyráza
- **Detekce nukleotidu začleněného do nově-syntetizovaného vlákna pomocí luminiscence**
- Roche – GS FLX Titanium, GSJunior

## SOLID chemie

- Solid – Life Technologies- Applied Biosystems
- **Detekce fluorescence**
- Kombinace dvou nukleotidů, vícero primerů
- Galaxy software

## Ion Torrent technologie

- Nejnovější technologie
- Celogenomový
- Personální využití – PGM systém
- **Detekce změny pH**











# Přístrojové vybavení

- Klasická vertikální elektroforéza
- Gelové sekvenátory – plošné PAGE gely, ruční příprava
  - Applied Biosystems, Bio-Rad, Beckman
- Kapilární sekvenátory – komerčně dostupné polymery – denaturační / nedenační, automatické „nanášení“ vzorků, elektroforéza v kapiláře
  - (Applied Biosystems, Amersham Pharmacie BioTech, Beckman)
    - ABI PRISM 310, 3100, 3100-*Avant*, 3730, ABI 3500 Genetic Analyzer; MegaBACE 500, 750, 1000, 15000, 4000; CEQ 8000, CEQ 8800

- 1986 – 1. sekvenátor (Perkin-Elmer)
- Gelové poloautomatické sekvenátory
- Vývoj úrovně automatizace – princip kapilární elektroforézy
- 1 – 4 – 8 – 16 – 24 – 96 kapilár
- Vývoj ovládacího softwaru
- Vývoj kvality, kvantity a rychlosti zpracování vzorků
- Sekvenování **první generace** – **Sanger** – do 1000 bp
- Sekvenování **druhé generace** – **celogenomové** – paralelní sekvenování amplifikovaného DNA templátu – 3 Gbp/run → 20 Gbp/run → 100 Gbp/run
- Sekvenování **třetí generace** – rychlé a dlouhé čtení – **sekvenování jedné molekuly**



ABI PRISM®  
310 Genetic

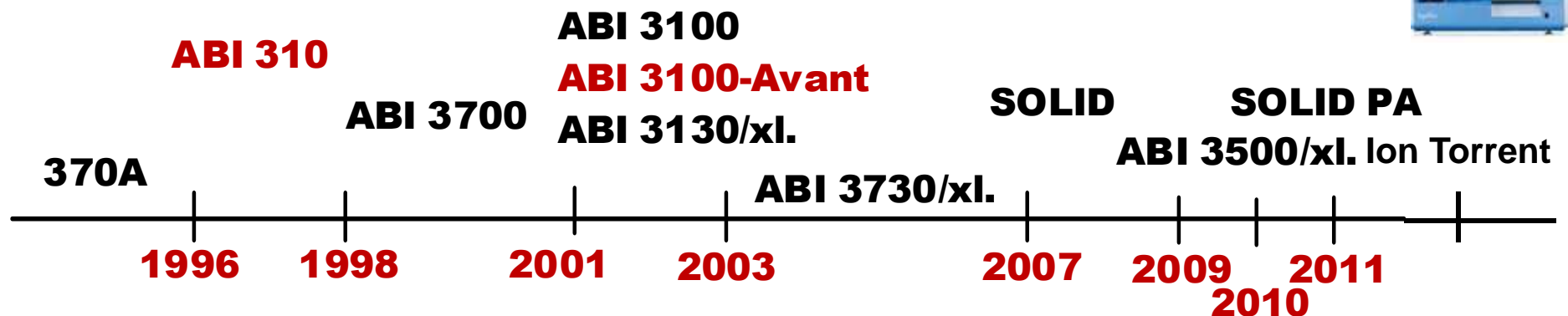
Applied Biosystems  
3130 Genetic Analyzer

Applied Biosystems  
3130xl Genetic Analyzer

Applied Biosystems  
3730 DNA Analyzer

Applied Biosystems  
3730xl DNA Analyzer

**Key applications:** *De novo* sequencing • Resequencing • Mutation/heterozygote detection  
SNP genotyping • Relative fluorescent quantitation • Microsatellite analysis • AFLP® analysis  
Methylation analysis • T-RFLP analysis • MLST • BAC fingerprinting • SAGE™





**SOLID 3 Plus System**  
**Applied Biosystems**



**Genome Sequencer FLX System**  
**Roche Diagnostics**

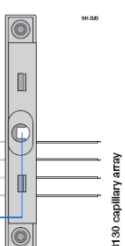
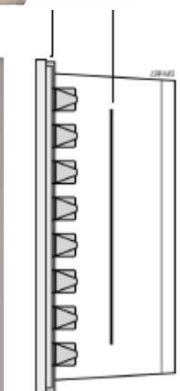


**Illumina Genome Analyzer IIx**

**CEQ 8000 Beckman Coulter**







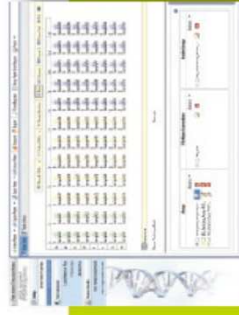
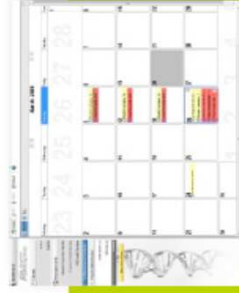


Plate Setup



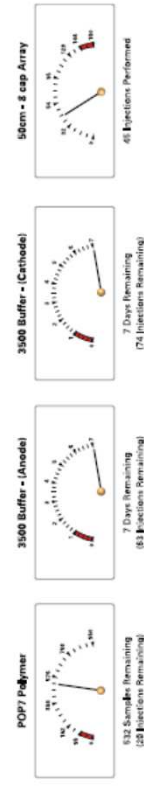
Monitor Run



Maintenance Scheduling Calendar



- Quick Start Run
- Create New Plate
- Create Plate from Template
- Edit Existing Plate
- View Run Results
- Maintain Instrument



Capillary Array



Cathode Buffer Container

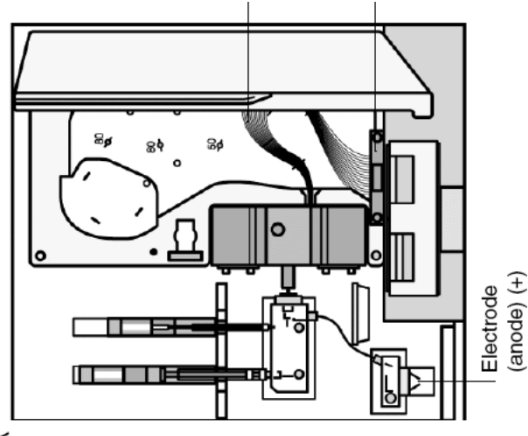
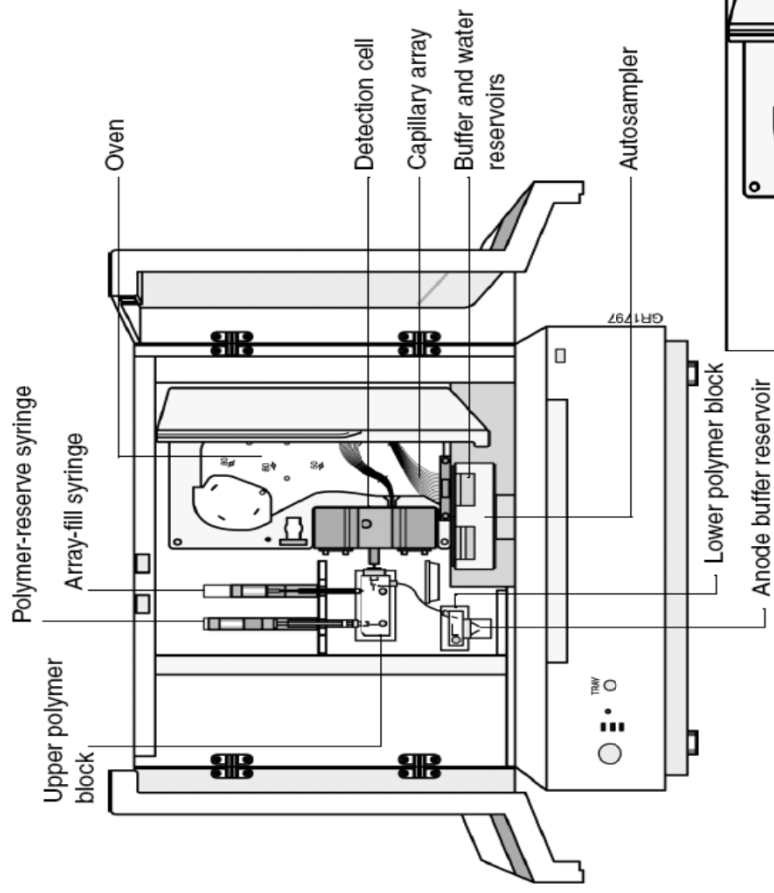
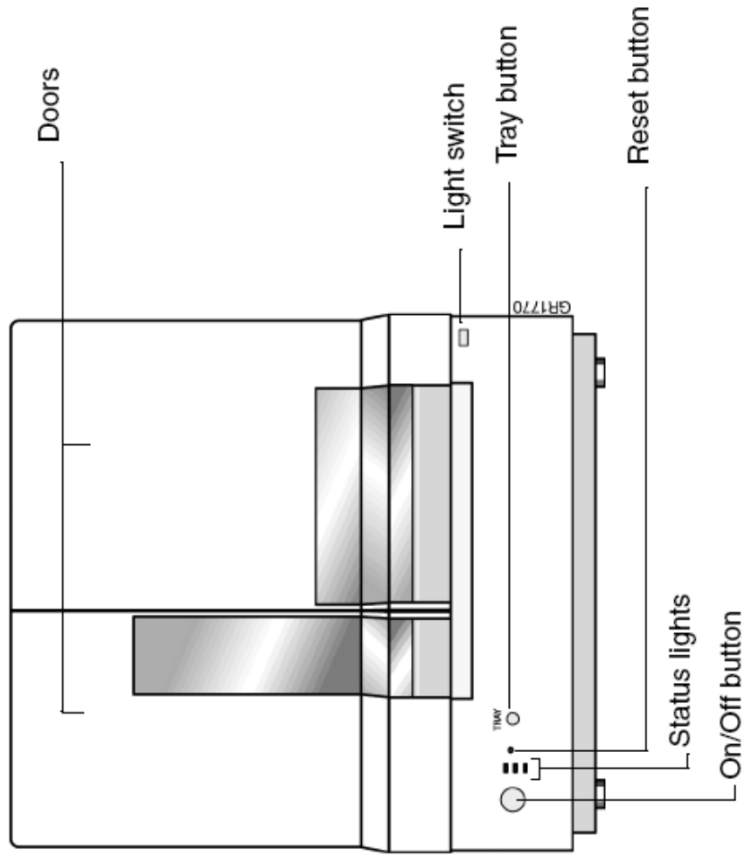


Anode Buffer Container



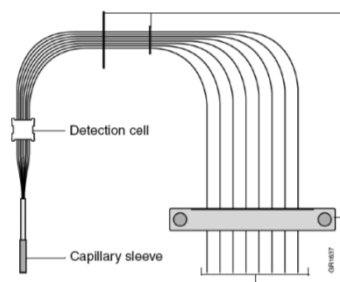
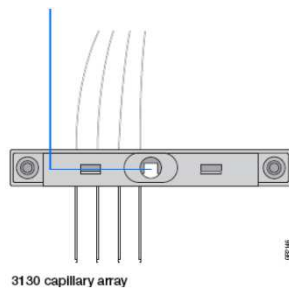
# ABI Prism 3100-Avant Genetic Analyzer a metoda sekvenování

- Automatický autosampler
- Plata pro 96 vzorků
- 4 kapiláry – paralelní runy
- Pícka
- Detekční prostor (laser, optika, CCD kamera, okénko kapiláry)
- Katody a anoda
- Elektroforetický pufr
- Dávkování polymeru – systém stříkaček
- Ovládací software



# Možnosti ABI Prism 3100-Avant

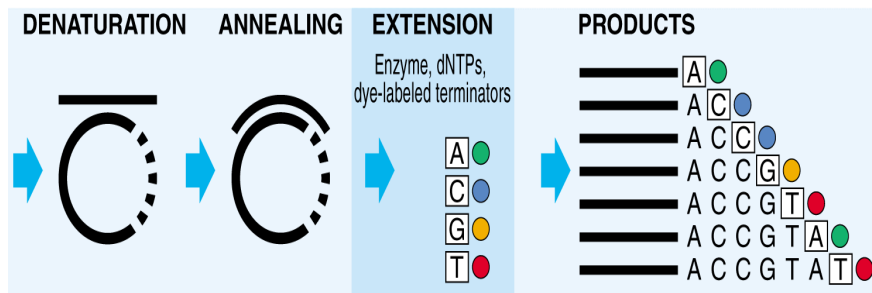
Capillary Length	Polymer	Application	Run Module	Run Time	Resolution	Performance	KB Q20 LOR**
22 cm	POP-4™	High throughput SNP analysis	SNP22_POP4	15 min	250 bp	0.50 SD†	--
		High throughput, small size fragment analysis	FragmentAnalysis22_POP4	20 min	400 bp		
36 cm		Standard SNP analysis	SNP36_POP4	30 min	250 bp		
		Standard fragment analysis	FragmentAnalysis36_POP4	45 min	400 bp		
		Ultra rapid sequencing	UltraSeq36_POP4	40 min	500 bp	98.5% *	400 bp
POP-6™	Rapid sequencing	RapidSeq36_POP6	1 hr	500 bp			
50 cm	POP-4™	Standard sequencing	StdSeq50_POP4	1 hr 40 min	--	--	600 bp
		Long fragment analysis	FragmentAnalysis50_POP4	1 hr 5 min	500 bp	0.15 SD†	--
	POP-6™	Long fragment analysis	FragmentAnalysis50_POP6	1 hr 30 min			--
		Standard sequencing	StdSeq50_POP6	2 hr 30 min	650 bp	98.5% *	600 bp
80 cm	POP-4™	Long read sequencing	LongSeq80_POP4	3 hr 40 min	950 bp		700 bp



# Princip metody sekvenování na ABI

Postup: purifikace DNA templátu – PCR amplifikace a přečištění produktu – cyklické sekvenování – přečištění sekvenační reakce – kapilární elektroforéza – analýza dat

## Dye terminator chemistry



## Templát – koncentrace, čistota

## Primer - specifita

Pufr

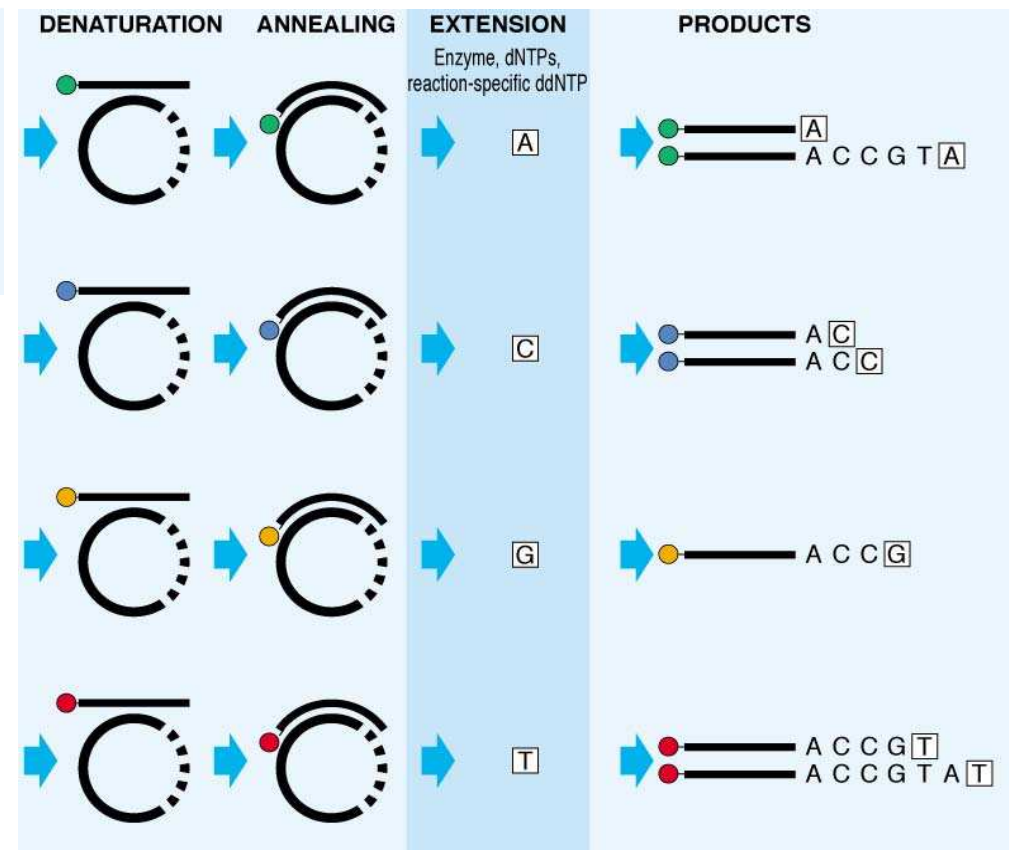
dNTP

ddNTP

## Taq DNA polymeráza



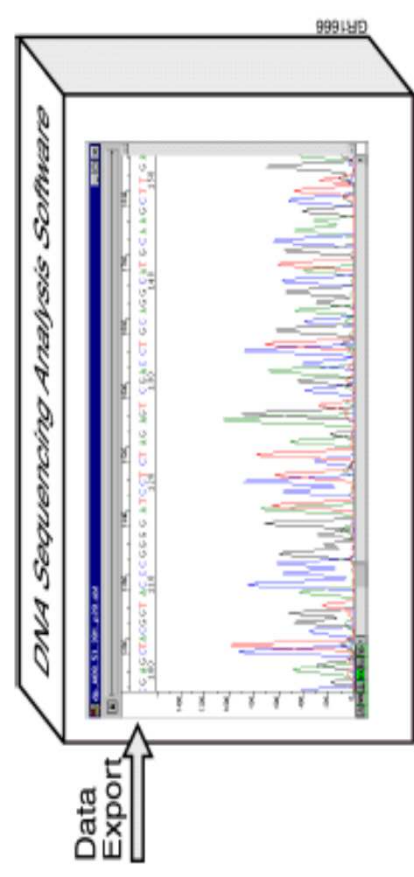
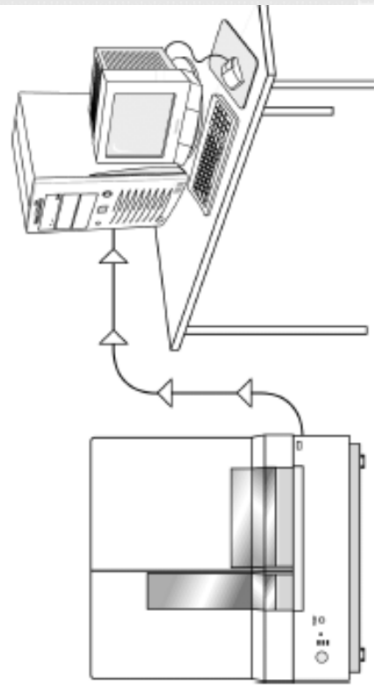
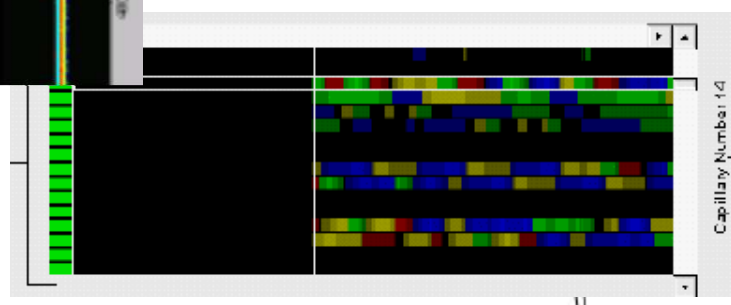
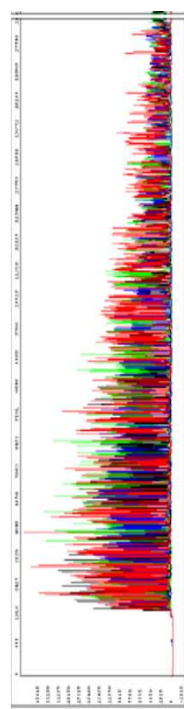
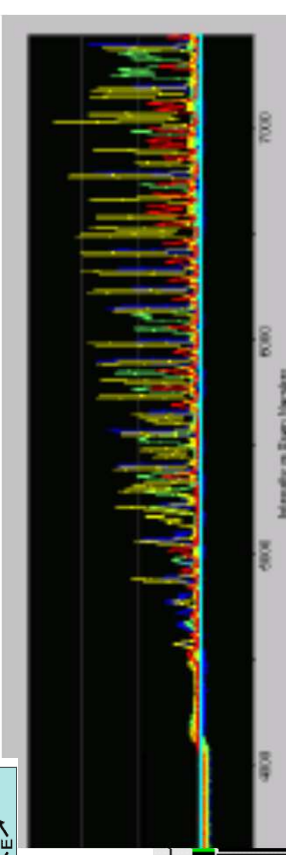
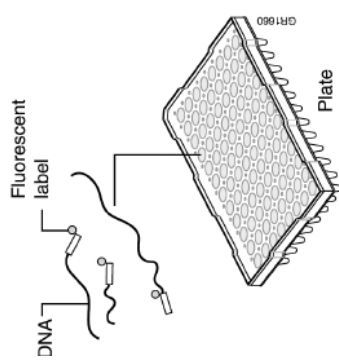
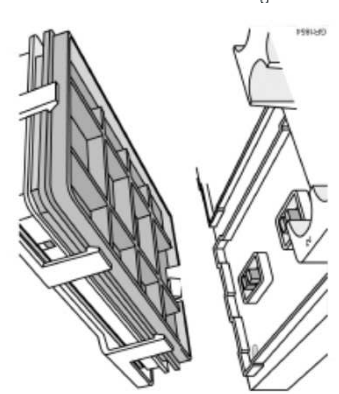
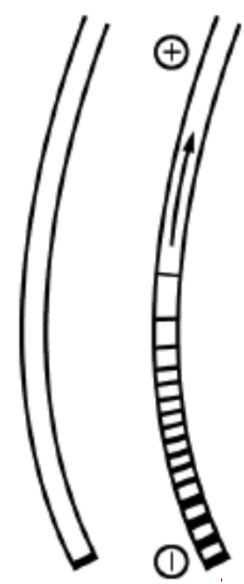
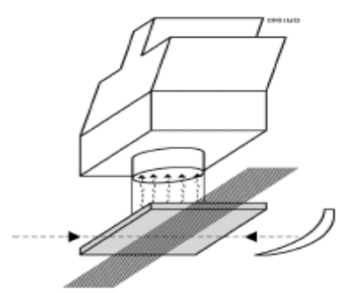
## Dye primer chemistry



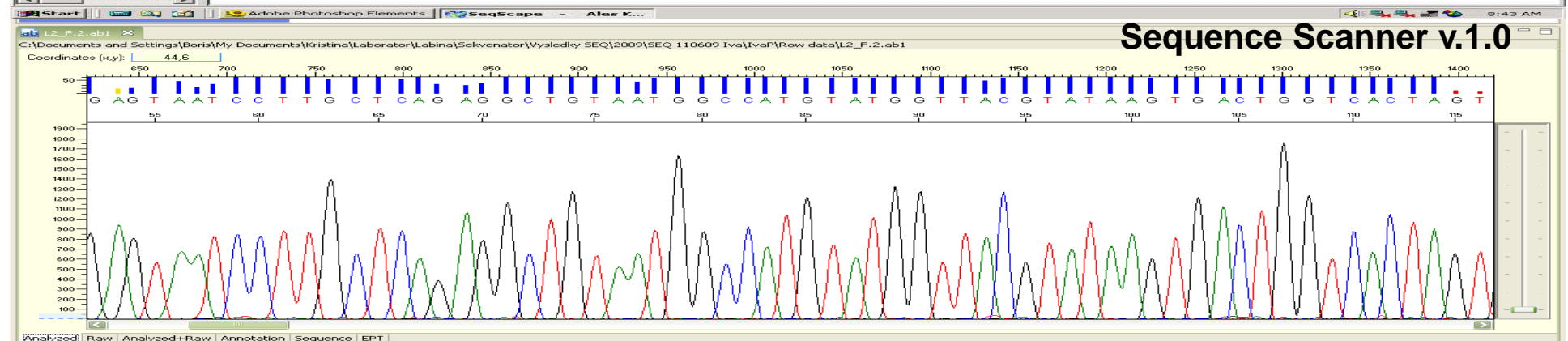
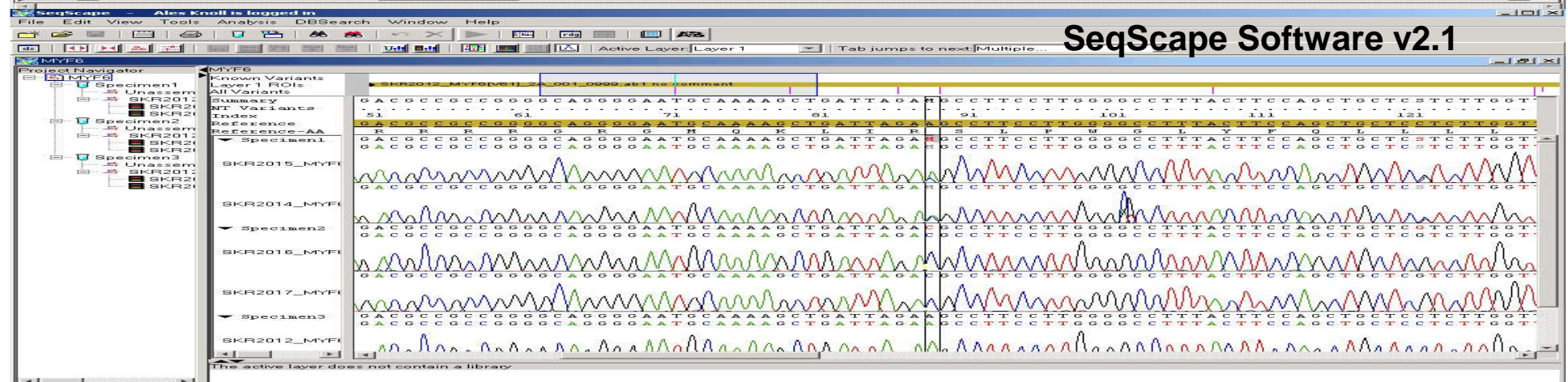
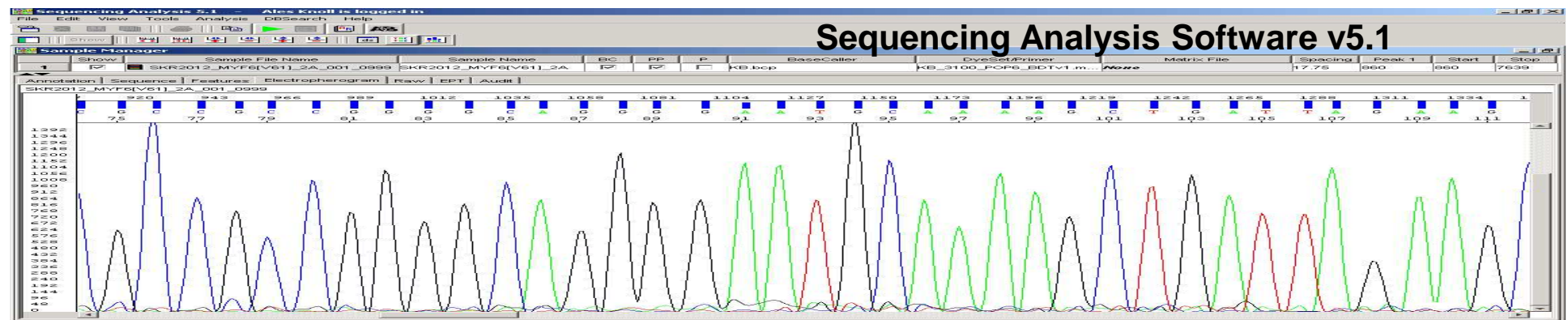
# Princip práce stroje

- Ovládání softwarem – DataCollection
- Elektrokinetická injektáž – objem vzorku zůstává nezměněn
- Pohyb fragmentů DNA gelem (polymerem) v elektrickém poli
- Definování správných podmínek runu (modul) – bere v úvahu směs použitých fluorochromů, délku kapiláry (50-80 cm), polymer (POP6)...
- Detekce emise fluoroforu při přechodu detekčním okénkem
- Převod dat: spektra – raw data – elektroforetogram
- Vyhodnocení a analýza







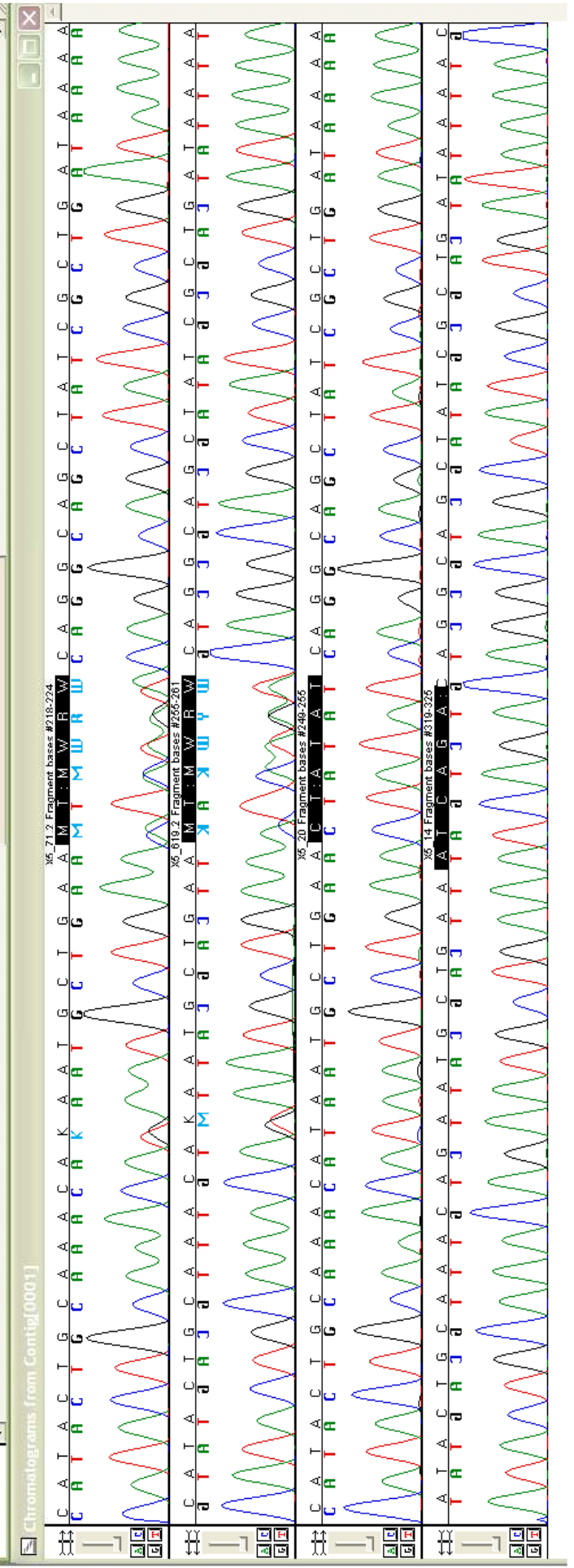
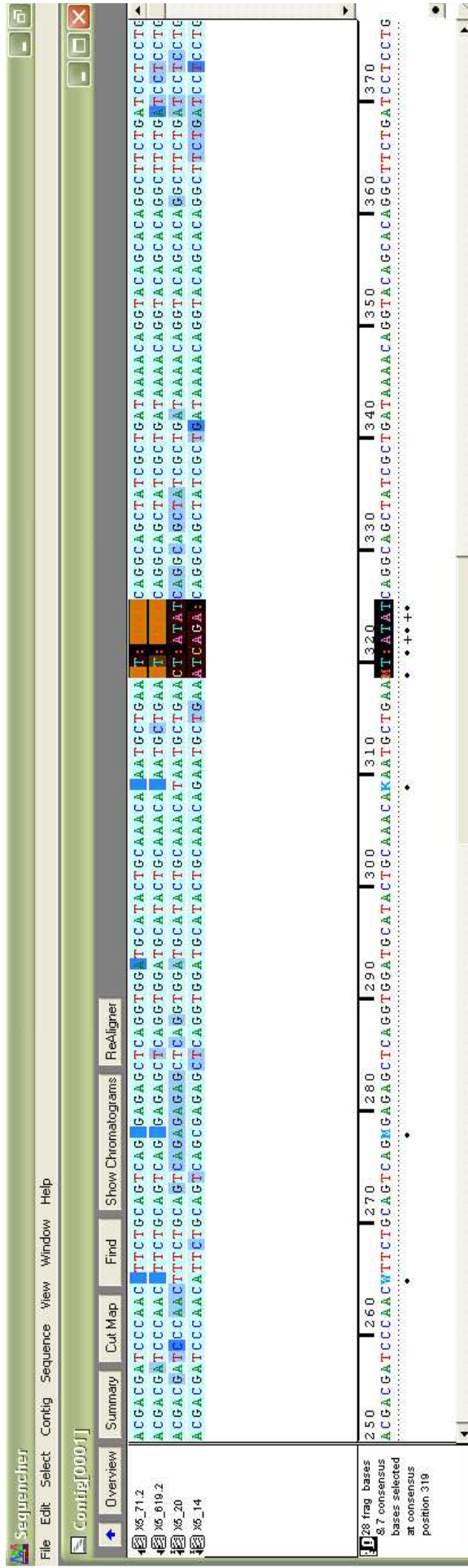


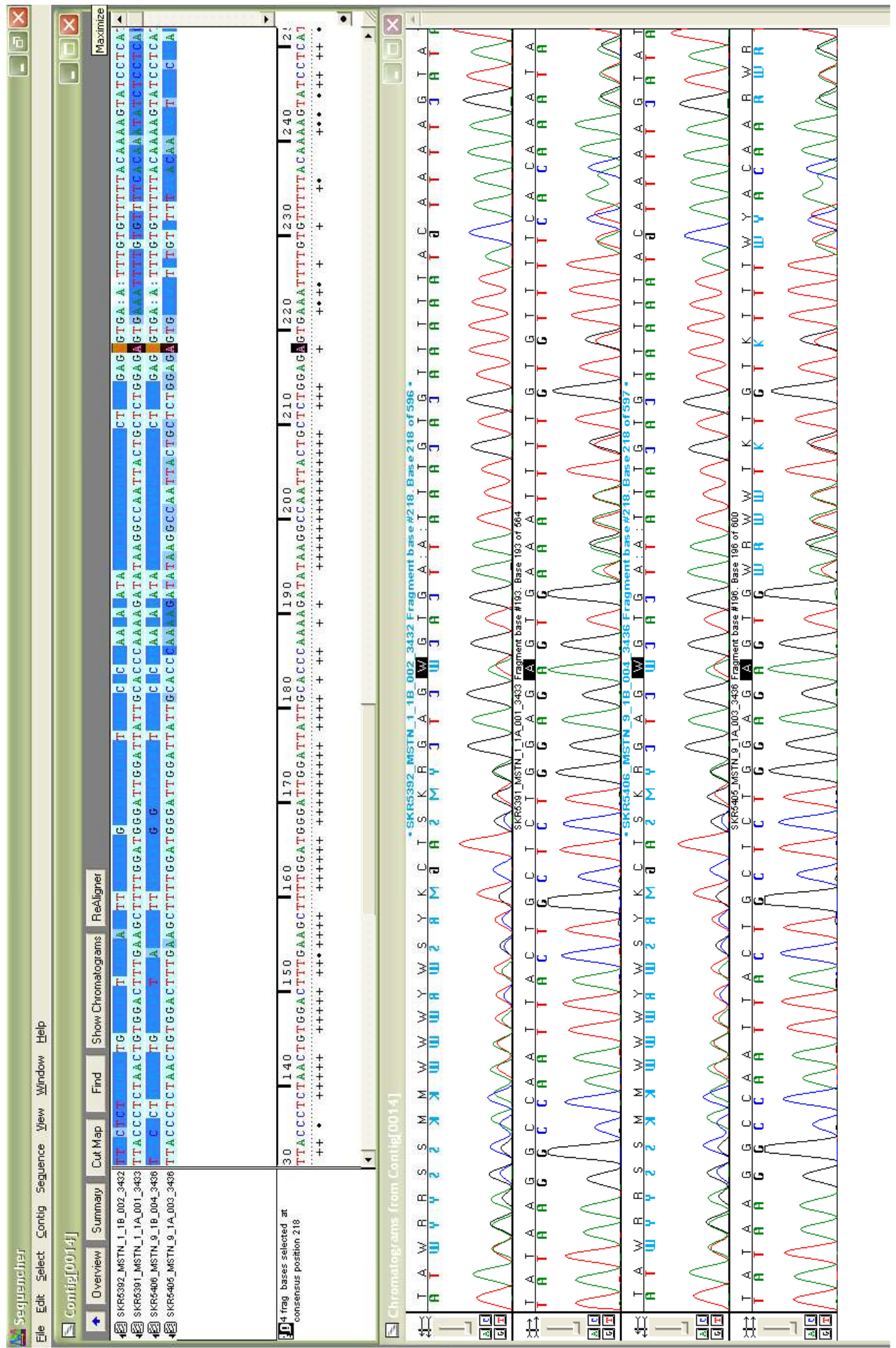
# Aplikace a využití metody sekvenování

- Sekvenování *de novo*
- Resekvenování
- detekce mutací – SNP, INDELs (nutné rozklonování PCR produktů k detekcím jednotlivých alel)
- evoluce genů
- vnitrodruhové studie
- mezidruhové studie







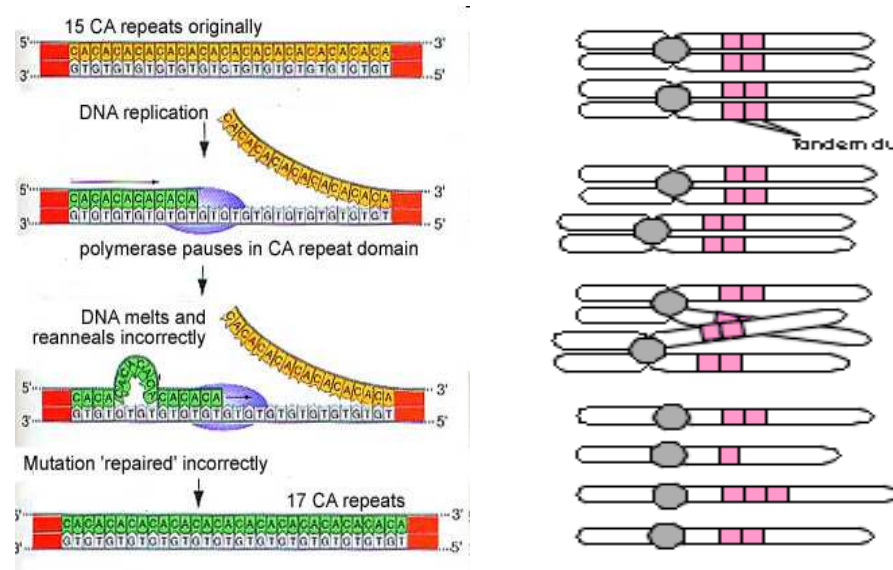


# Mikrosatelity – definice a využití

- STR, SSR – jednoduché motivy, VNTR – složité motivy
- Různé typy motivů v tandemovém opakování
  - Mononukleotidový motiv – jednoduchá repetice (polyA) **(A)<sub>n</sub>**
  - Dinukleotidový motiv – nejčastější v panelech v určování původu hospodářských zvířat **(GT)<sub>n</sub>**
  - Trinukleotidový motiv – vhodnější na odečet (panely u psů) – kombinace s di-nt motivy v panelech **(GTC)<sub>n</sub>**
  - Tetranukleotidový motiv – panely pro určování původu u zvířat i lidí, vhodné na odečet, ne tak časté **(ATCT)<sub>n</sub>**
  - Složené motivy – složité sekvence – zejména u nižších živočichů
    - *Bythinella*  
GA(CA)<sub>3</sub>(GACA)<sub>4</sub>(GA)<sub>2</sub>(CA)<sub>2</sub>(GA)<sub>22</sub>CA(GA)<sub>7</sub>CA(GA)<sub>4</sub>CA(GA)<sub>4</sub>CA(GA)<sub>7</sub>
    - *Gammarus*  
[(CAT)<sub>2</sub>CACC(CAT)<sub>2</sub>C]<sub>2</sub>(CAT)<sub>2</sub>CACC(CAT)<sub>5</sub>G(CAT)<sub>2</sub>CACC(CAT)<sub>2</sub>



- Polymorfismus na základě variability opakování – vysoce polymorfní
- Multialelické – zdroj genetické variability
- Klasické Mendelovské křížení a segregace
- Vznik nových alel – DNA pol. slippage, chyby v crossing-overu během meiózy
- Zejména v nekódujících oblastech – intergenové oblasti (genetický balast) a intragenové oblasti (UTR, introny)



# Funkce a využití MS

- Funkce neověřená - ochotně rekombinují, tvoří sekundární struktury (vliv na replikaci DNA a buněčný cyklus), možná regulace genové aktivity (transkripce a translace)
- Využití zejména:
  - v populačních studiích (struktura populace, fylogenetické analýzy, geografická vazba)
  - forenzní genetika (15 MS+amylogenin)
  - identifikace jedince (paternita, parentita, původ – i u zvířat – nutnost stanovení genetického profilu)
  - diagnostika a určování onemocnění (zvířata i lidi, vazbové markery)
  - konstrukce vazbových map (potřeba rodin a populací – existují již komerční kity např. ABI Prism Human Linkage Mapping Site)

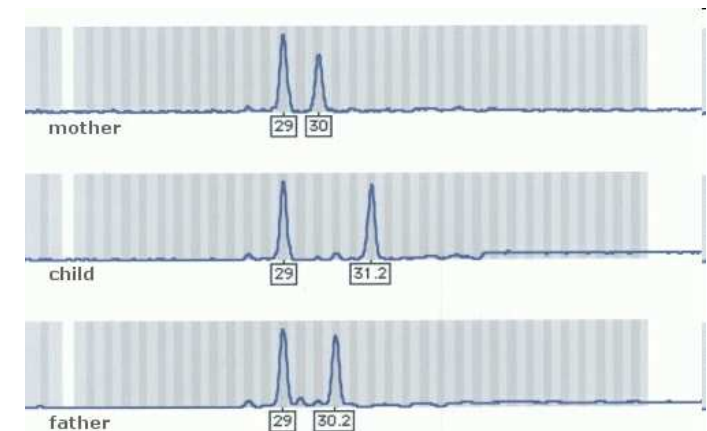
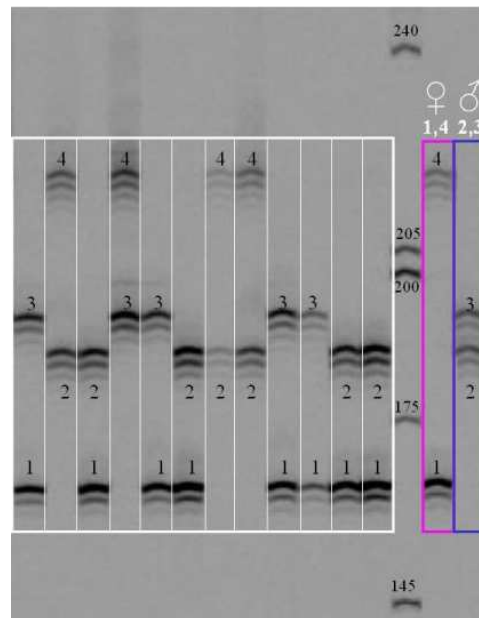
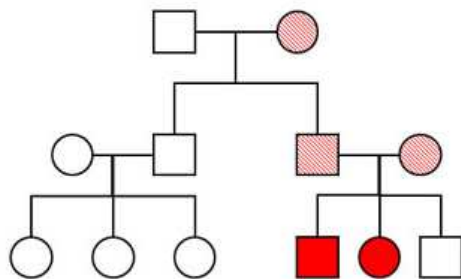
# Velikost alel mikrosatelitních markerů a jejich variabilita

- Variabilita v opakování motivu – variabilní délka amplifikovaného fragmentu
- Možná modifikace (mutace) v místě nasedání primeru – falešná homozygita, nulové alely
- Možné chyby při PCR amplifikaci – sklouznutí DNA polymerázy, amplifikace nespecifického místa
- Přidávání adeninu na konec fragmentu
- Nestabilita při amplifikaci – polymeráza dělá čím dál tím kratší fragmenty

**CGTAGCCTTGCATCCTTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTATCGGTACTACGTGG**  
**CGTAGCCTTGCATCCTTCTCTCTCTCTCTATCGGTACTACGTGG**  
**CGTAGCCTTGCATCCTTCTCTATCGGTACTACGTGG**

# Historie hodnocení variability mikrosatelitních markerů

- Genealogie – tvorba rodokmenů
- PCR amplifikace variabilních míst v genomu – horizontální gelová elektroforéza (EtBr)
- Fragmentační analýza kapilární gelovou elektroforézou (fluorofory)



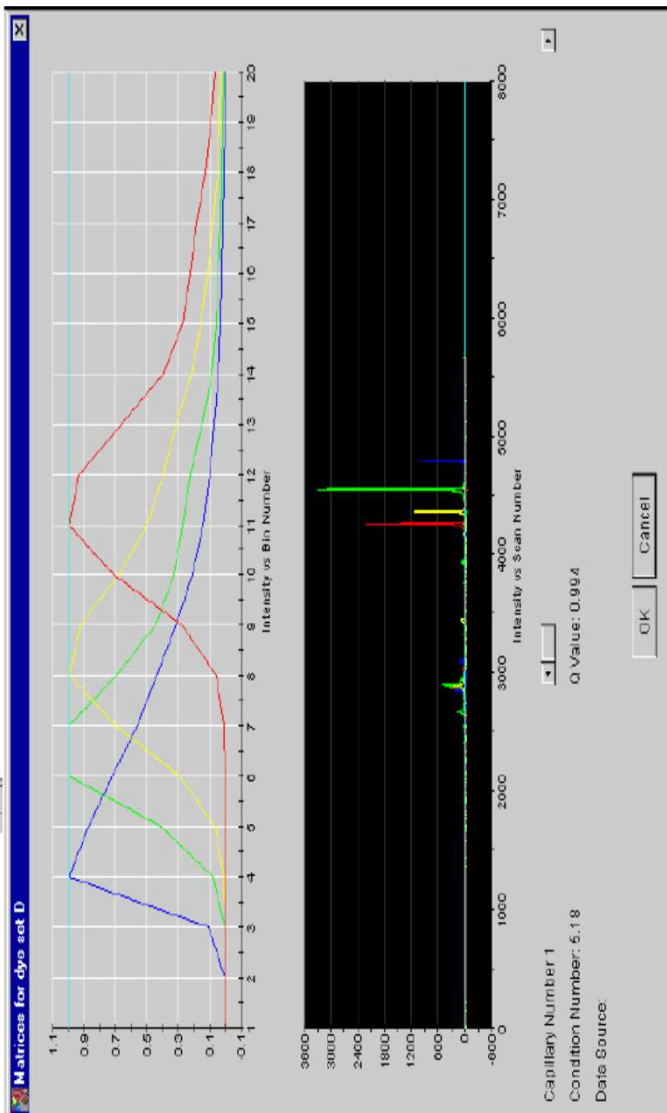
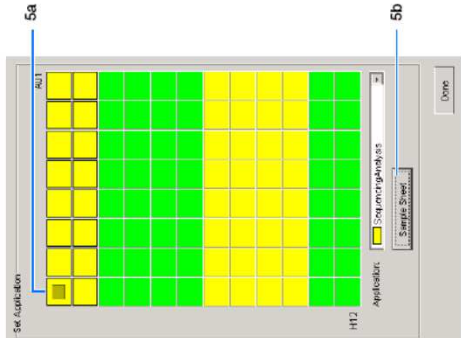
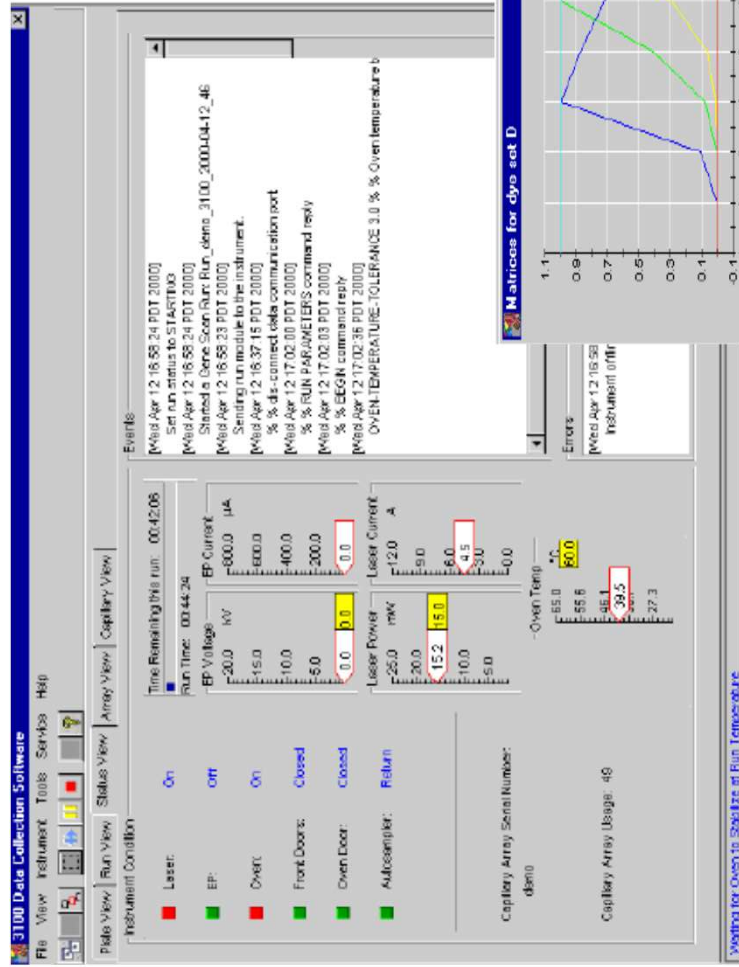
# Princip fragmentační analýzy kapilární elektroforézou FA-CE

- Nezajímá nás sekvence fragmentů
- Důležité – počet bazí (délka fragmentů), množství DNA (určuje výška píku)
- Relativní size-ovací metoda – potřeba interního standardu (alignment by time scale/size scale)
- Vícero píků+artefakty – nutno odlišit konkrétní alelu
- 1 vs. vícero markerů – počet rozhoduje
- Amplifikace polymorfního místa PCR (možnost multiplex) – důležitá kvalita a kvantita templátu (empirické stanovení)
- Značení fragmentů pomocí značeného primeru (5' modifikace fluoroforem)
- Separace amplifikovaných fragmentů v elektrickém poli kapilární gelovou elektroforézou



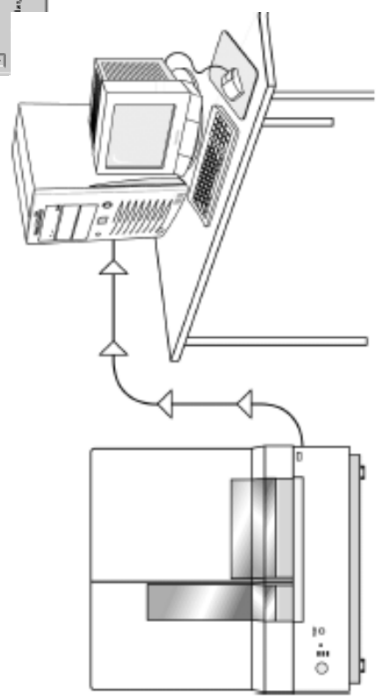
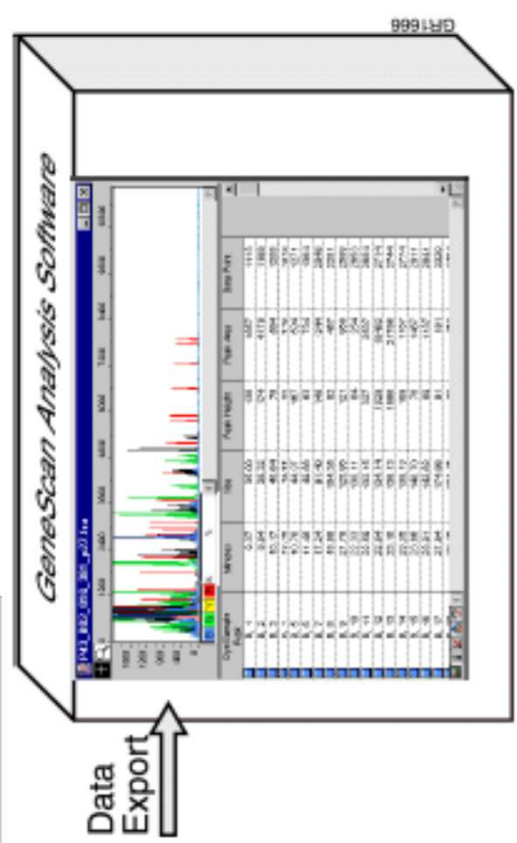
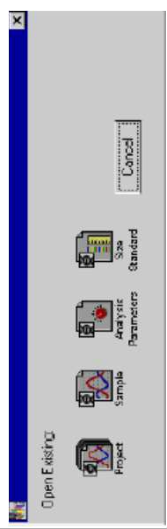
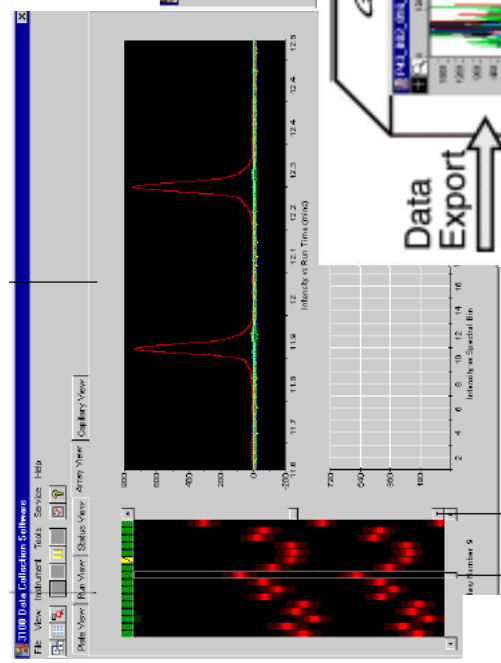
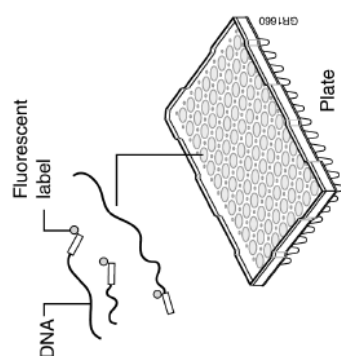
- Příprava vzorku pro FA – denaturační činidlo (formamid)+interní standard velikosti fragmentů
- Sekvenátor
- Kapilára – 36 cm, polymer POP4, matrice a spektrální kalibrace pro daný modul FA
- Ovládání softwarem – DataCollection
- Elektrokinetická injektáž – objem vzorku zůstává nezměněn
- Pohyb fragmentů DNA gelem
- Definování správných podmínek runu (modul) – bere v úvahu směs použitých fluorochromů, délku kapiláry
- Detekce emise fluoroforu při přechodu detekčním okénkem
- Převod dat – spektra – raw data – elektroforetogram
- Vyhodnocení a analýza – GeneScan + Genotyper, GeneMapper+PeakScanner

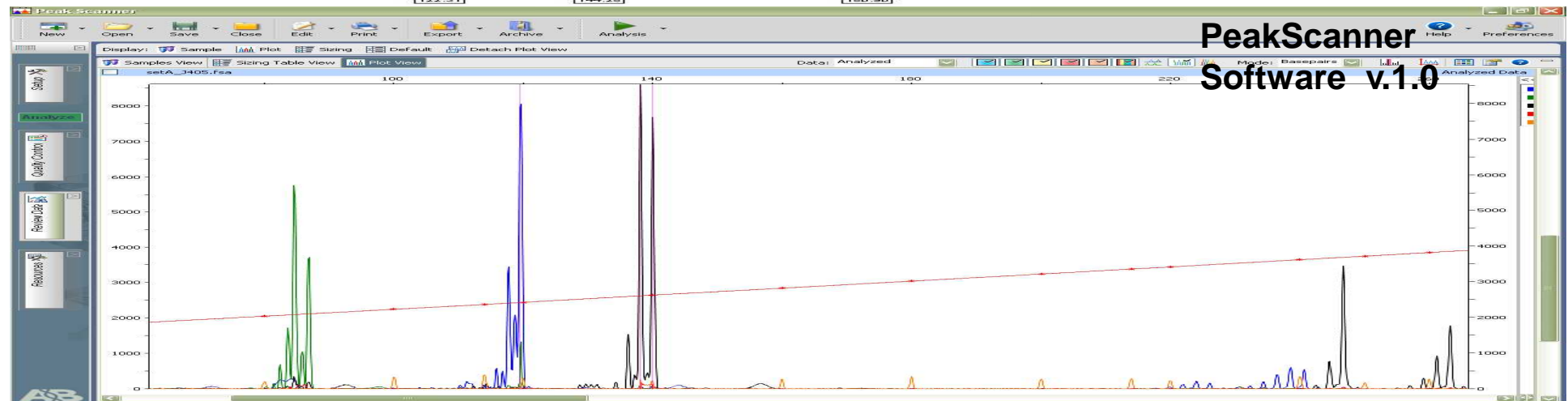
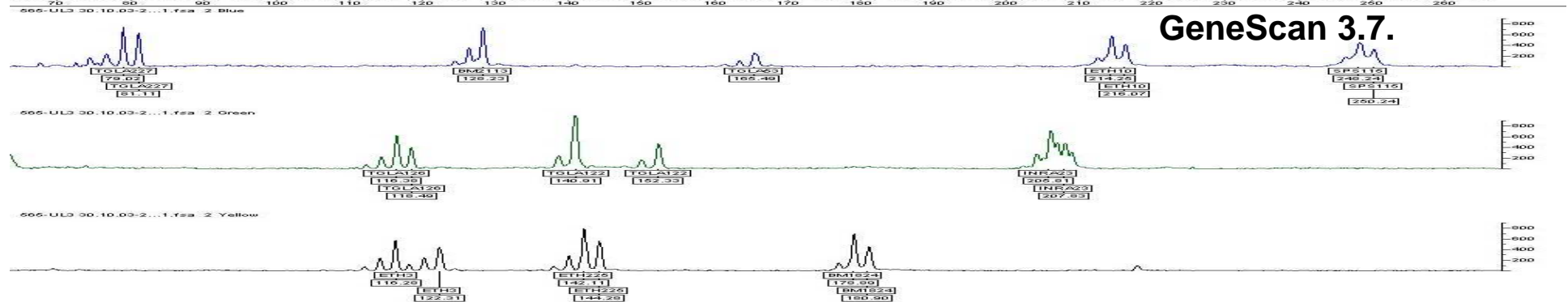
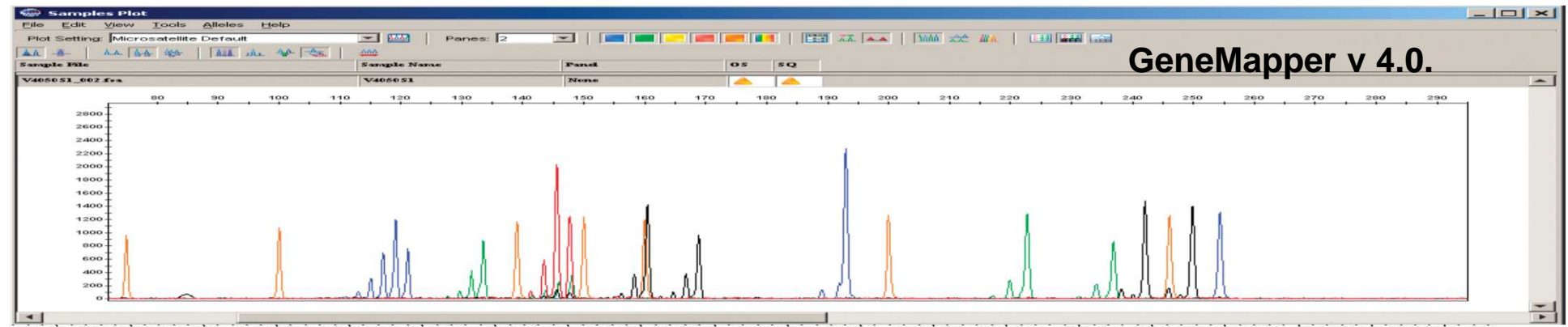


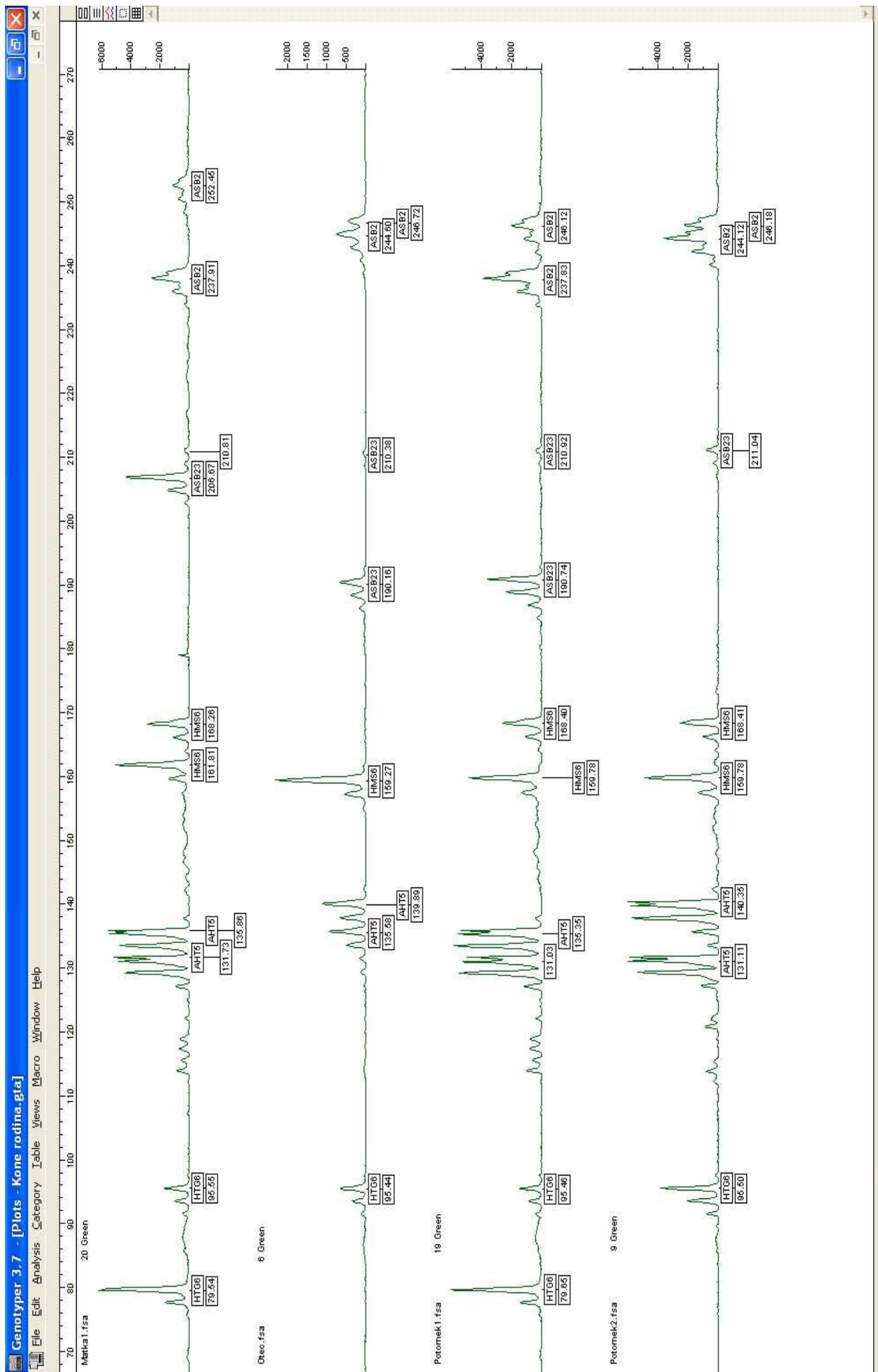


Dye Sets, Dye Chemistry, and Applications:

Dye Set	Dye Chemistry	Application Kit
DS-30 (D)	6-FAM™ (blue), HEX™ (green), NED™ (yellow), ROX™ (red)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Linkage Mapping Sets-LD20, -MD10, and -HD5</li> <li>Custom Oligos</li> </ul>
DS-31 (D)	New 4-Dye Chemistry: 6-FAM (blue), VIC™ (green), NED (yellow), ROX (red)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Linkage Mapping Custom Oligos</li> <li>Mouse Mapping Markers</li> <li>Custom Oligos</li> </ul>
DS-32 (F)	5-FAM™, JOE™, NED, ROX	<ul style="list-style-type: none"> <li>AmpFISTR® products</li> <li>Stockmarks™</li> </ul>
DS-33 (G5)	6-FAM, VIC, NED, PET™, LIZ™	<ul style="list-style-type: none"> <li>AmpFISTR® Identifier™</li> <li>Custom Oligos</li> </ul>
DS-42 (E5)	dR110, dR6G, dTAMRA™, dROX™, LIZ	SNAPshot™ Multiplex Kit







# Kritéria pro tvorbu panelů MS markerů

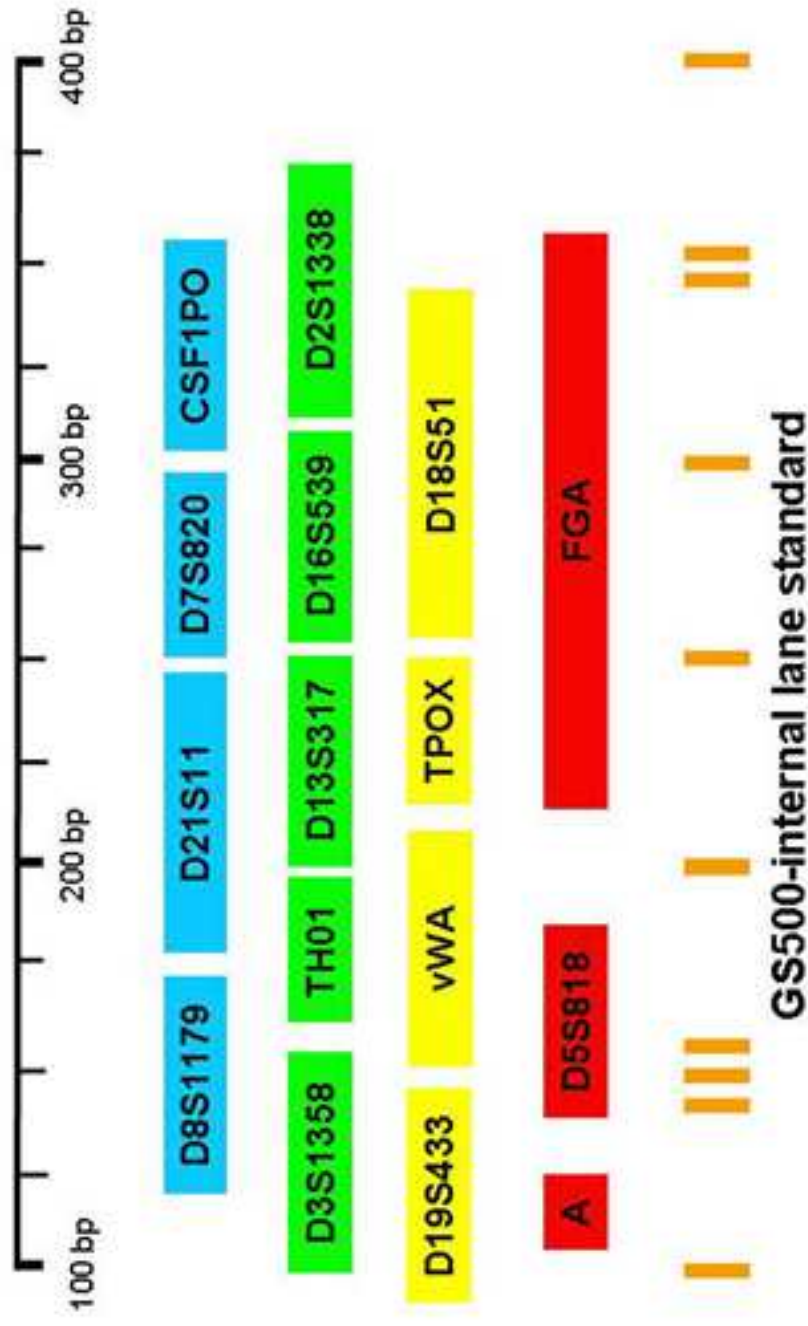
- Počet je rozhodující
- Pokrytí celého genomu (téměř všechny chromosomy)
- Co největší variabilita, množství alel
- Vysoký PIC (polymorfní informační obsah)
- Minimum nulových alel
- Vhodnost pro multiplex-PCR
- Velikostní rozpětí fragmentů alel, vliv na použití fluorochromu na značení
- 6-FAM, NED, PET, ROX, HEX, VIC, JOE, LIZ – možnosti 4 a 5 dye systémů

# Typy MS panelů

- Člověk
- Skot, Prase, Kůň
- Psi (10), dravci – sokol (tmavý, raroh, lovecký, stěhovavý), poštolka, orel (5), jelen, kočka
- Ryby (různé rody i druhy)
- Bezobratlí – šneci, blešivci, mravenci, mouchy etc...malé panely



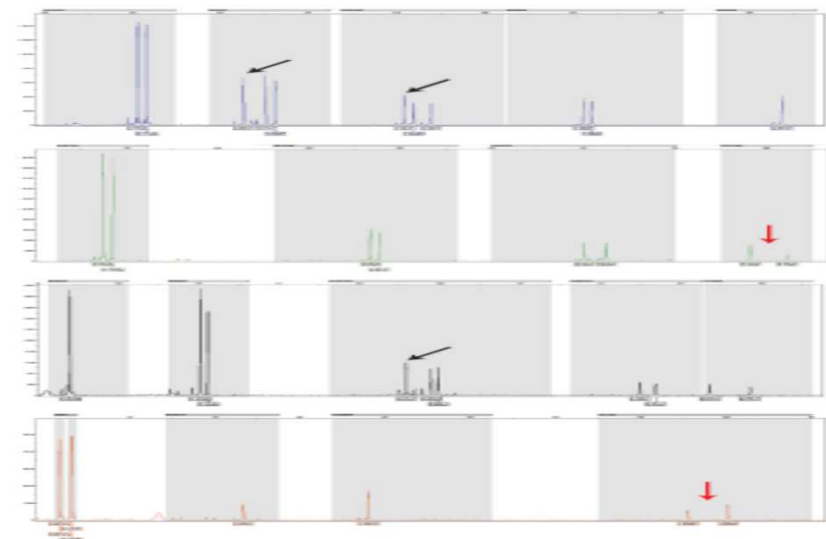
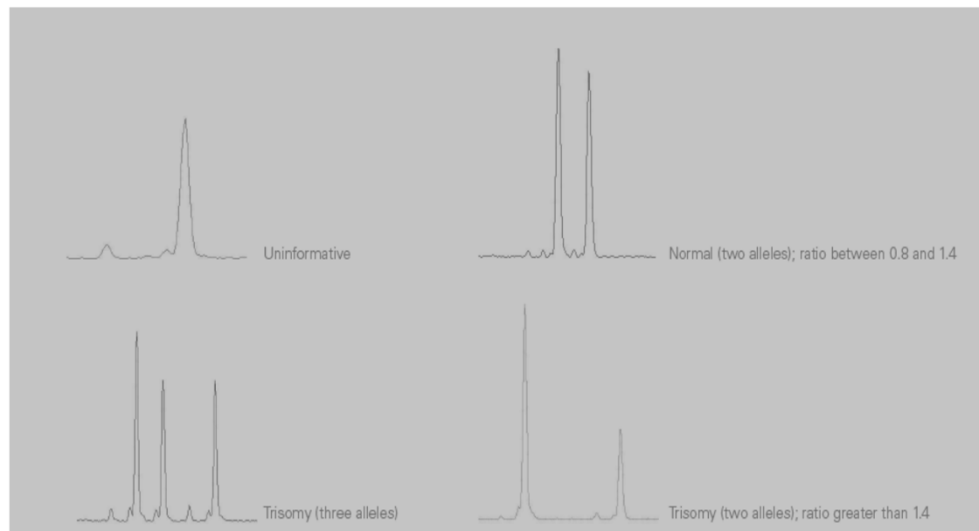
# AmpFSTR® Identifier™



lokus	chromozom	fluorescenční značka	barva	rozsah (v bp)
<b><i>VHL20</i></b>	30	FAM	modrá	83-102
<b><i>HTG4</i></b>	9	FAM	modrá	116-137
<b><i>AHT4</i></b>	24	FAM	modrá	140-166
<b><i>HMS7</i></b>	1	FAM	modrá	167-187
<b><i>HTG6</i></b>	15	VIC	zelená	74-103
<b><i>AHT5</i></b>	6	VIC	zelená	126-147
<b><i>HMS6</i></b>	4	VIC	zelená	154-170
<b><i>ASB23</i></b>	3	VIC	zelená	176-212
<b><i>ASB2</i></b>	15	VIC	zelená	237-268
<b><i>HTG10</i></b>	21	NED	žlutá	83-110
<b><i>HTG7</i></b>	4	NED	žlutá	114-128
<b><i>HMS3</i></b>	9	NED	žlutá	146-170
<b><i>HMS2</i></b>	10	NED	žlutá	215-236
<b><i>ASB17</i></b>	2	PET	červená	104-116
<b><i>LEX3</i></b>	X	PET	červená	137-160
<b><i>HMS1</i></b>	15	PET	červená	166-178
<b><i>CA425</i></b>	28	PET	červená	224-247

# Možnost stanovit množství DNA pomocí FA

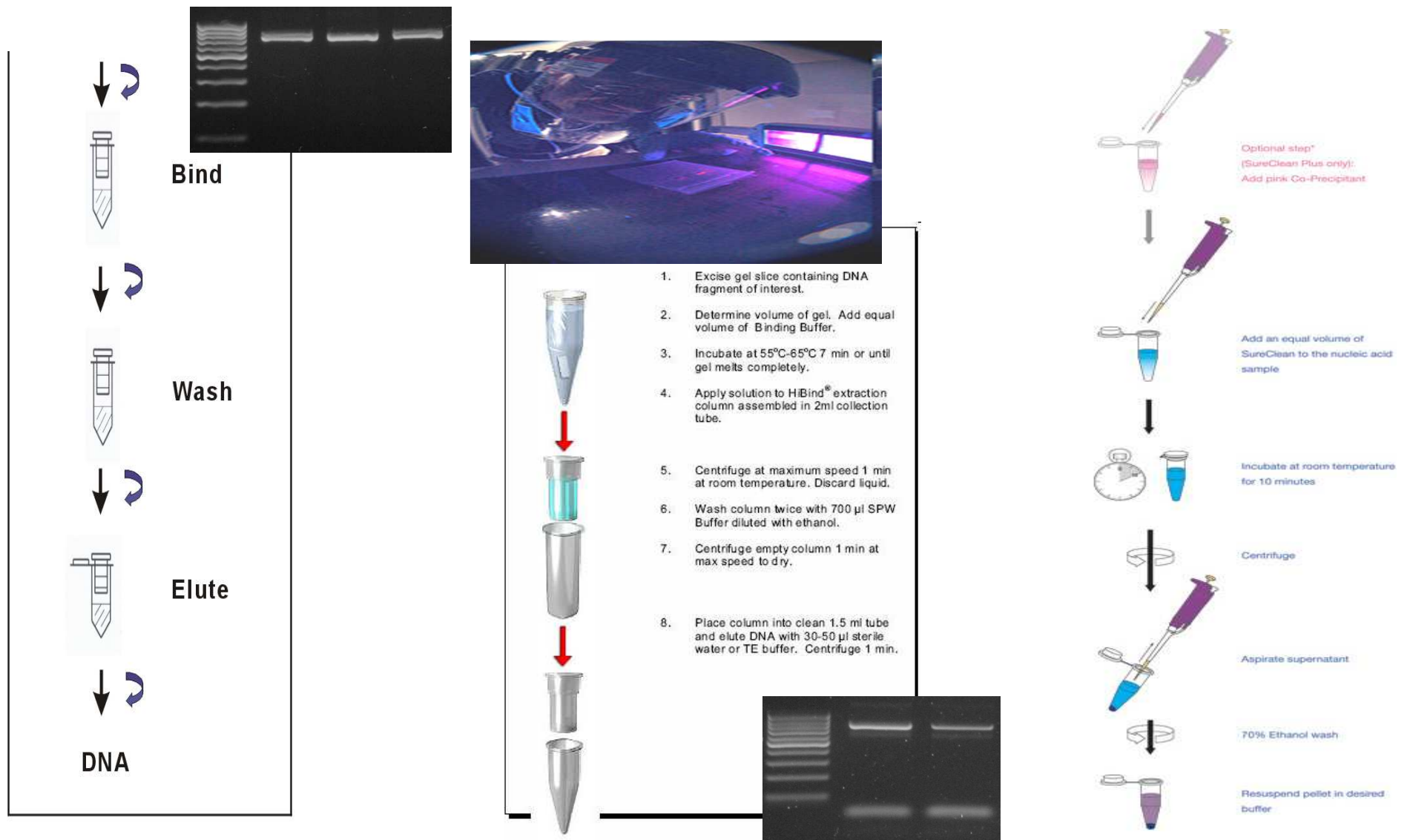
- Nezaměňovat s kvantifikací pomocí qPCR
- Určení množství amplikonu pomocí výšky a plochy píku
- Nepřesné a relativní – hrozí „plato efekt“ (vyčerpání systému)
- Využívané při detekci onemocnění způsobenými polyploidii
- Trisomie chromosomu 21 u lidí – Downův syndrom



# Sekvenační reakce - příprava

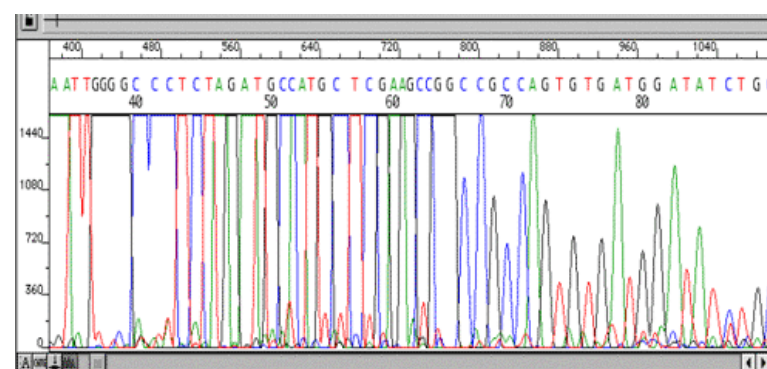
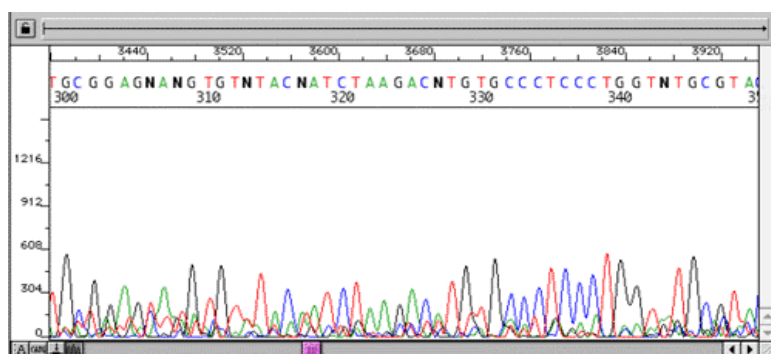
- Templát – PCR, BAC, plazmidový vektor,
- Možnosti přečištění PCR
  - Kolony
  - Purifikace fragmentu z gelu – nespecifity nebo dimery primerů
  - SureClean
- Možnosti stanovení koncentrace PCR produktu po purifikaci
  - Spektrofotometricky
  - Gelová elektroforéza – porovnání velikosti a koncentrace s markerem
  - Na základě fluorescence – Qubit
  - Nanodrop – kvalita i kvantita (koncentrace DNA při 260 nm, do up to 3700 ng/ul bez ředění)
- Reagence sekvenační PCR
  - Typy sekvenačních kitů
  - Tabulka využití
- Teplotní profil reakce – klasický vs. fast

# Přečištění PCR produktu

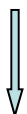


# Stanovení koncentrace

Template	Cycle Sequencing Chemistry				
	BigDye Terminator v1.1 and v3.1	BigDye XTerminator Purification Kit	dGTP BigDye Terminator v3.0	dRhodamine Terminator	BigDye Primer
PCR product:					
100 to 200 bp	1 to 3 ng	0.5 to 3 ng	1 to 3 ng	1 to 3 ng	2 to 5 ng
200 to 500 bp	3 to 10 ng	1 to 10 ng	3 to 10 ng	3 to 10 ng	5 to 10 ng
500 to 1000 bp	5 to 20 ng	2 to 20 ng	5 to 20 ng	5 to 20 ng	10 to 20 ng
1000 to 2000 bp	10 to 40 ng	5 to 40 ng	10 to 40 ng	10 to 40 ng	20 to 50 ng
>2000 bp	40 to 100 ng	10 to 50 ng	40 to 100 ng	40 to 100 ng	50 to 150 ng
Bisulfite converted genomic DNA-PCR product	3 to 10 ng	3 to 10 ng	not recommended	not recommended	not recommended
Single-stranded DNA	50 to 100 ng	10 to 50 ng	50 to 100 ng	50 to 100 ng	150 to 400 ng
Double-stranded DNA	200 to 500 ng	50 to 300 ng	200 to 500 ng	200 to 500 ng	200 to 800 ng
Cosmid, BAC	0.5 to 1.0 µg	200 to 1,000 ng	0.5 to 1.0 µg	not recommended	0.5 to 1.0 µg
Bacterial genomic DNA	2 to 3 µg	1,000 to 3,000 ng	2 to 3 µg	not recommended	not recommended





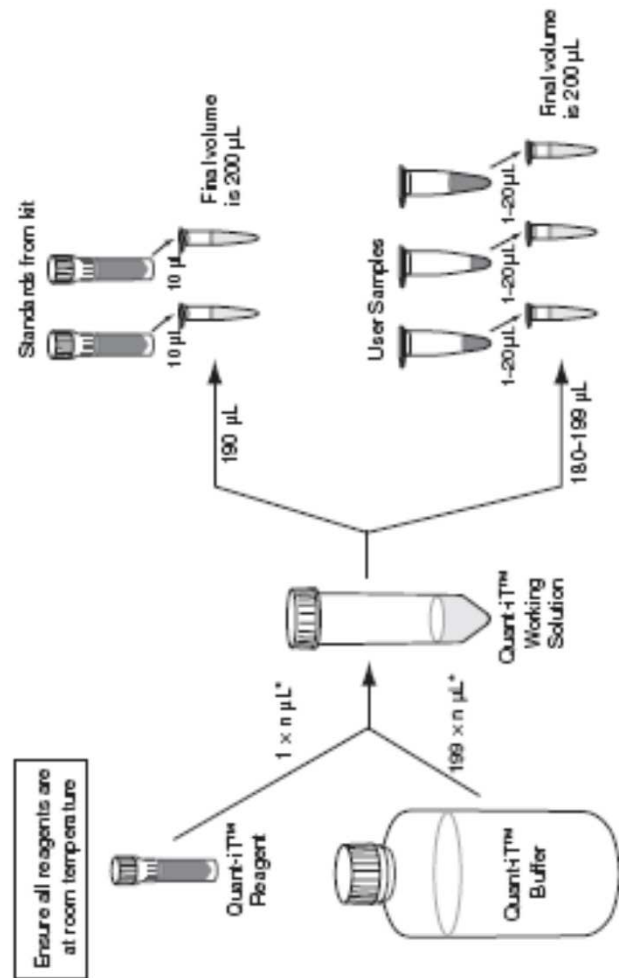
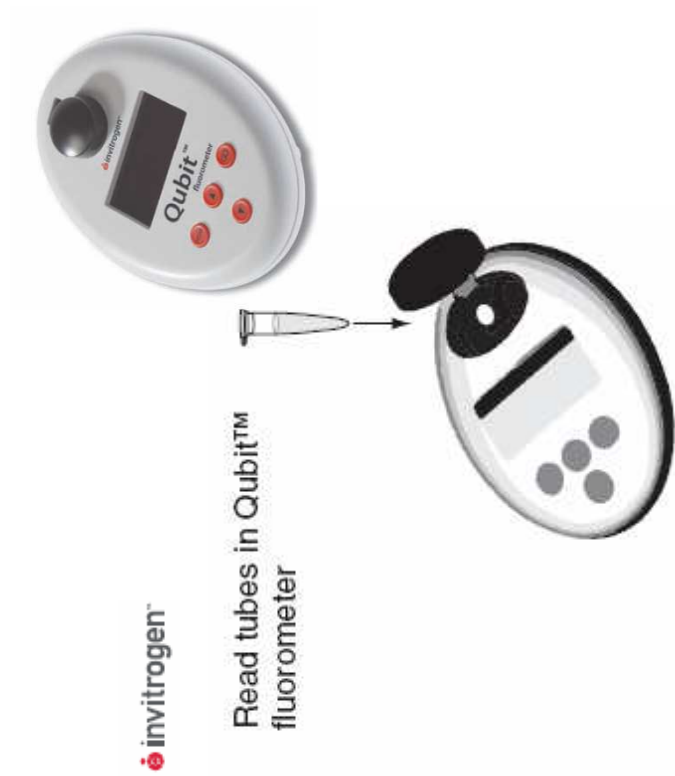


marker (v  $\mu$ l)

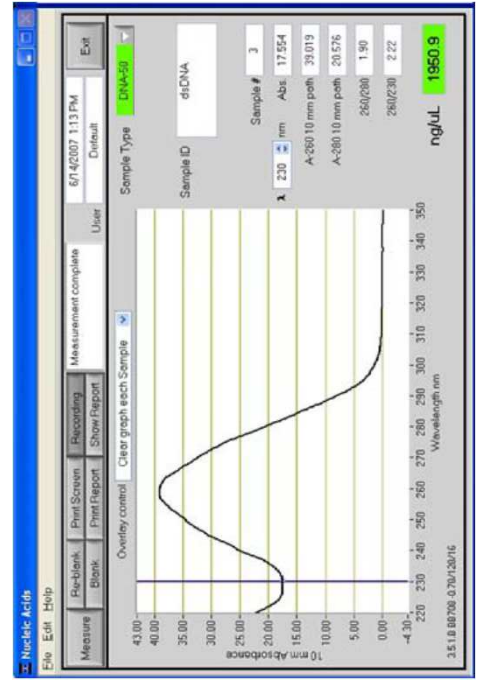
PCR 20 10 5 2,5 1,25 0,625



fragментy	množství DNA v ng na gelu při nanášení ředěného markeru:						
	20 $\mu$ l	10 $\mu$ l	5 $\mu$ l	2,5 $\mu$ l	1,25 $\mu$ l	0,625 $\mu$ l	0,312 $\mu$ l
1031	206	103	51,5	25,75	12,875	6,4375	3,2136
900	180	90	45	22,5	11,25	5,625	2,808
800	160	80	40	20	10	5	2,496
700	140	70	35	17,5	8,75	4,375	2,184
600	120	60	30	15	7,5	3,75	1,872
500	200	100	50	25	12,5	6,25	3,12
400	80	40	20	10	5	2,5	1,248
300	60	30	15	7,5	3,75	1,875	0,936
250	50	25	12,5	6,25	3,125	1,5625	0,78
200	80	40	20	10	5	2,5	1,248
150	30	15	7,5	3,75	1,875	0,9375	0,468
100	60	30	15	7,5	3,75	1,875	0,936
50	40	20	10	5	2,5	1,25	0,624



\* where n = number of Standards plus number of Samples



# Reagents sekvenační PCR a možnosti modifikace teplotního profilu

## Chemistry Options

Applications	BigDye® Terminator v3.1 Kit	BigDye® Terminator v1.1 Kit
<i>de novo</i> sequencing	+	✓
Resequencing	+	✓
Sequencing difficult templates	+	+
Long-read sequencing	+	✓
Sequencing across all template types (plasmids, PCR products, BACs, and fosmids)	+	✓
Mixed-base detection	+	✓
Sequencing short PCR products using rapid electrophoresis run modules	✓	+

+ Recommended    ✓ Satisfactory

Nové sekvenační kity

BigDye Direct Cycle Sequencing Kit

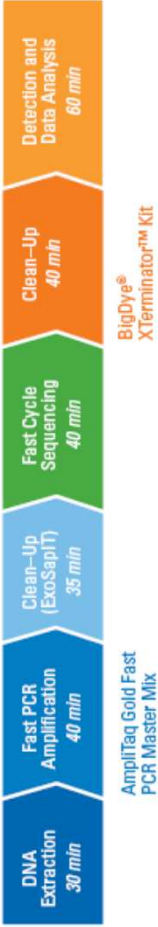
M13-tailed PCR primery

Výhody vs. nevýhody

Application	BigDye Terminator v3.1	BigDye Terminator v1.1	dGTP BigDye Terminator	dRhodamine Terminator	BigDye Primer
<b>DNA Sequencing Application</b>					
Bisulfite sequencing	+	++	-	-	-
Comparative sequencing (germline mutations 50:50 heterozygotes)	++	++	-	+	++
Comparative sequencing (somatic mutations 10:90 heterozygotes)	-	-	-	-	+
Comparative sequencing (somatic mutations 30:70 heterozygotes)	+	+	-	-	++
<i>De novo</i> sequencing	++	++	+	+	+
Gap closure (custom primers)	++	++	++ <sup>‡</sup>	+	-
Gene walking (custom primers)	++	++	+	+	-
Shotgun sequencing (universal primers, M13)	++	++	+	+	++
<b>DNA Sequence Context</b>					
AT-rich >65%	++	++	-	++	++
GC-rich >65%	++	++	+	+	+
GT-rich regions	+	+	++	++	++
Homopolymer A or T >25 bp <sup>§</sup>	-	-	-	++	-
<b>Template Type</b>					
BAC, cosmid, fosmid, lambda, large PCR product	++	++	-	+	+
Bacterial genomic DNA	++	++	-	-	-
Bisulfite-treated genomic DNA	+	++	-	-	-
PCR amplicon	++	++	+	++	++
PCR amplicon (heterozygous 10:90)	-	-	-	-	+



**Traditional Method** 690 min (11 hr 30 min)



**Fast Method** 245 min (4 hr 5 min)

Activation of Enzyme	PCR			PCR Final (Step)	
	Denature	Annealing	Extension	Hold	Hold
Hold	Cycle (35 Cycles)			Hold	Hold
95°C	96°C	Primer™*	68°C	72°C	4°C
10 Min	3 sec	3 sec	See Table Below	10 sec	∞

Cycle Sequencing			Denaturation	
Cycle (25 Cycles)			Hold	
Denature	Annealing	Extension	96°C	60°C
10 sec	3 sec	75 sec	1 Min	∞

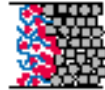
Recommended Extension Times:

Length (Kb)	Extension Time
0.5	5 sec
1.0	15 sec
1.5	30 sec

# Možnosti přečištění sekvenační reakce a příprava vzorku k analýze

- Ethanol (inhibitor)
- Kombinace kolony a ethanol – odstraní víc neinkorporovaných terminátorů
- BigDye X-Terminator Kit
  - Není potřeba pracovat s formamidem (teratogen)
  - když zkrátíme dobu třepání, neubere tolik krátkých fragmentů
  - Platíčkové verze – minimum pipetování

Start

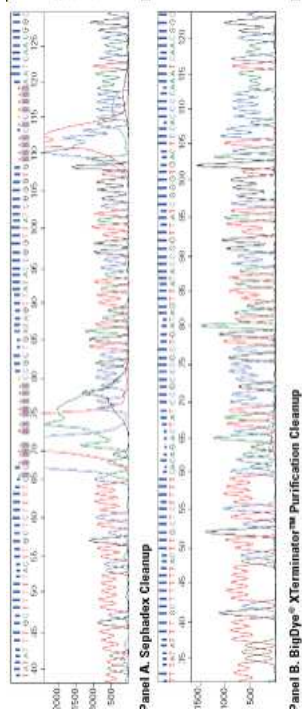
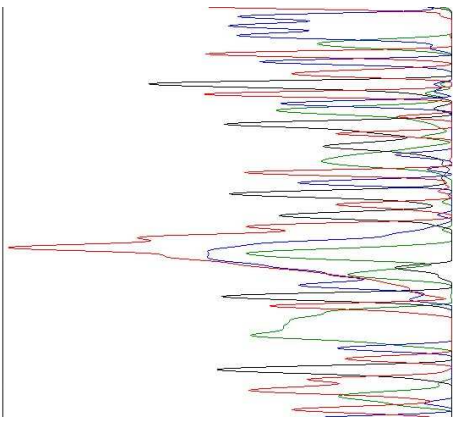
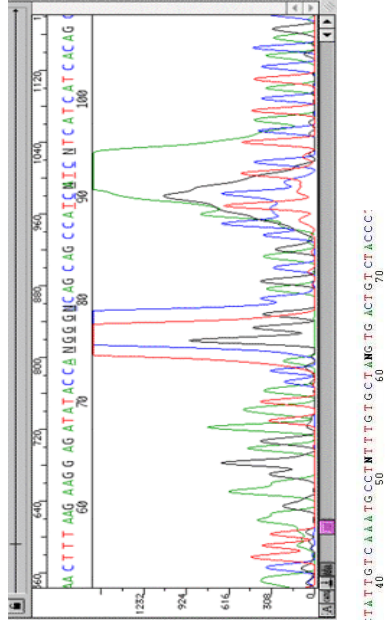
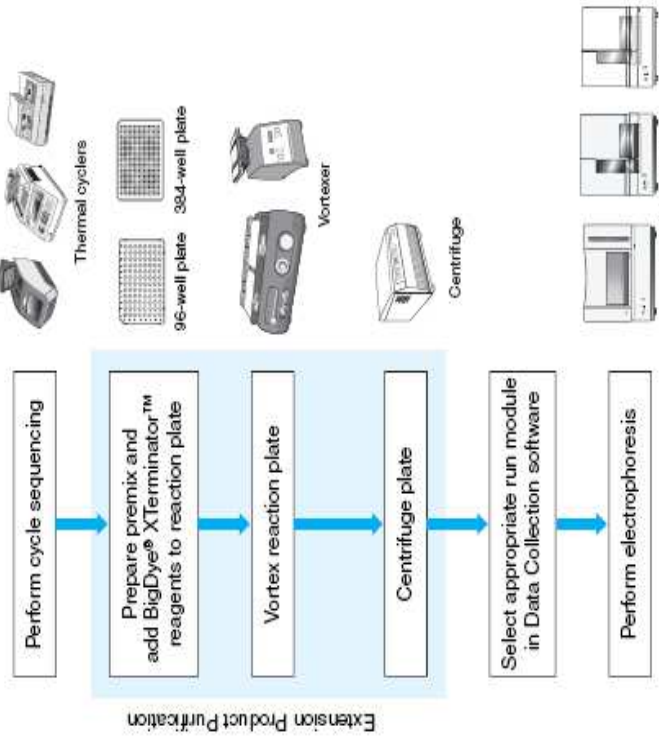


Separation



- Gel filtration material
- Dye terminator
- DNA
- Dye terminator inside gel filtration material

## BigDye® XTerminator™ Purification Kit Workflow





# Příprava stroje před runem – běžný uživatel

