

Elektroforéza Sekvenování



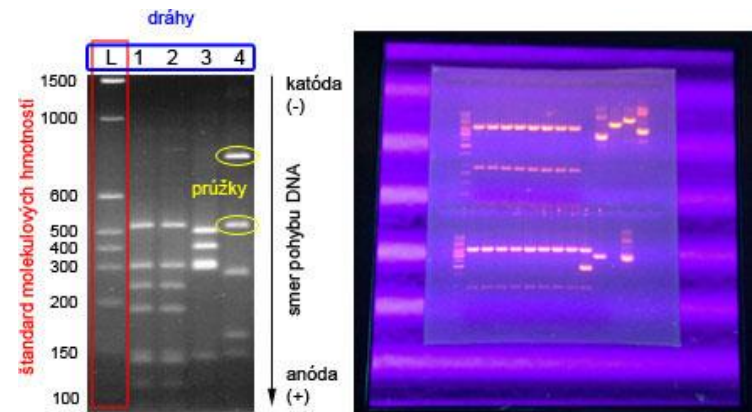
GeneProof
Molecular diagnostics for your routine

Výsledek PCR



Elektroforéza

- V molekulární biologii se používá k separaci nukleových kyselin a bílkovin
- Principem je pohyb nabitých molekul v elektrickém poli
- Gelová, polyakrylamidová



Obr. Schéma elektroforetickej separácie (vľavo) a gél pod UV svetlom (vpravo)

Elektroforéza

- **Arne Tiselius**
- Švédský chemik
- Nobelova cena v roce 1948 za objev elektroforézy a adsorpční analýzy



Princip elektroforézy

- Principem metody je **pohyb záporně nabitých molekul DNA v elektrickém poli směrem k anodě.**
- Hlavním nositelem náboje nukleových kyselin jsou záporně nabitě fosfátové skupiny.
- Separace molekul DNA podle jejich velikosti.

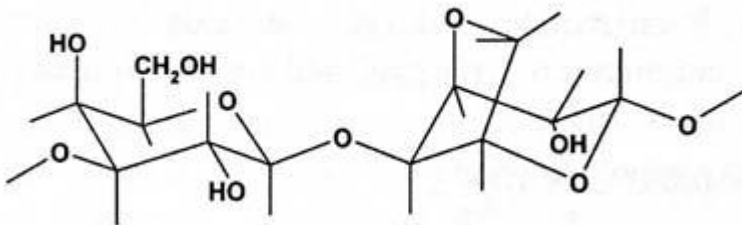
Nosiče

- **Agaróza**

- Agarosa je získávána z mořských řas
- Je to lineární polysacharid

- **Polyakrylamid**

- Polyakrylamidový gel vzniká polymerací akrylamidu s příměsí bisakrylamidu, který umožňuje zesíťování lineárních vláken a vytvoření prostorové struktury.



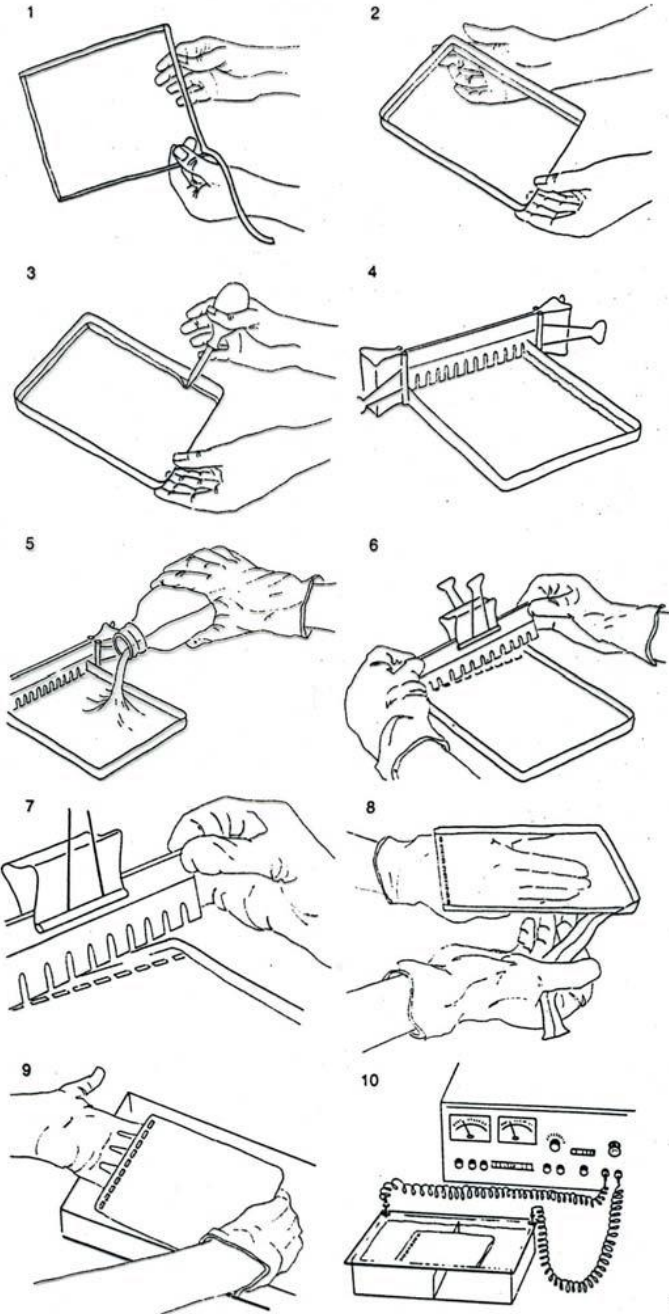
Nosiče

- **Agarózový gel**
- Snadná příprava
- Velké rozmezí velikostí molekul DNA, které je možné na agaróze dělit
- Vysoká cena
- Přírodní produkt, jednotlivé šarže i od stejného výrobce se mohou trochu lišit a poskytovat odlišné výsledky.
- DNA izolovaná z agarózového gelu **může být kontaminovaná** látkami (např. sacharidy, ionty kovů), které mohou inhibovat následně prováděné reakce (restrikční štěpení)
- **Polyakrylamidový gel**
- Pracnější příprava
- Třeba dávat větší pozor při manipulaci, protože akrylamid a N,N'-metylenbisakrylamid jsou vysoce **toxické** a kumulují se v organismu
- **Vysoká rozlišovací schopnost (0,2%),** tj. dokáže rozlišit např. DNA o délce 500 bp od DNA 501 bp
- Dokážou pojmout mnohem větší množství DNA než agarózové gely bez ztráty rozlišení
- DNA izolovaná z polyakrylamidového gelu je **vysoce čistá** a může být použita i pro velmi náročné molekulárně-biologické techniky (např. mikroinjekce DNA do myších embryí).

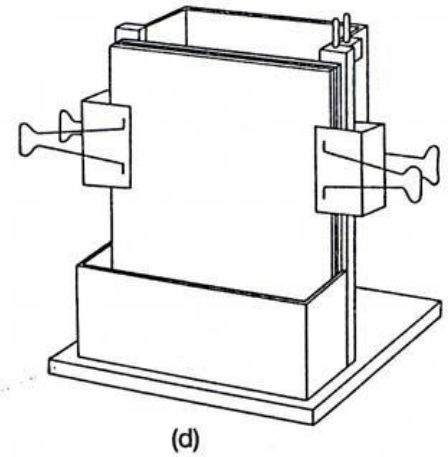
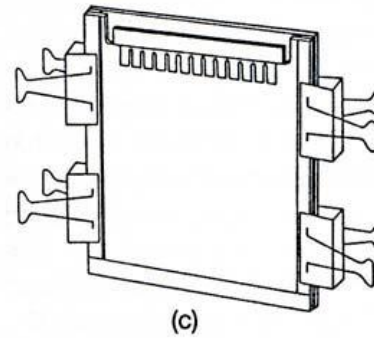
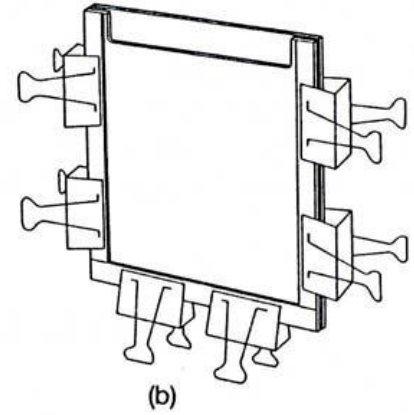
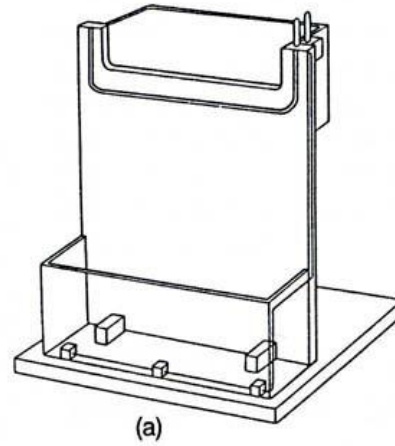
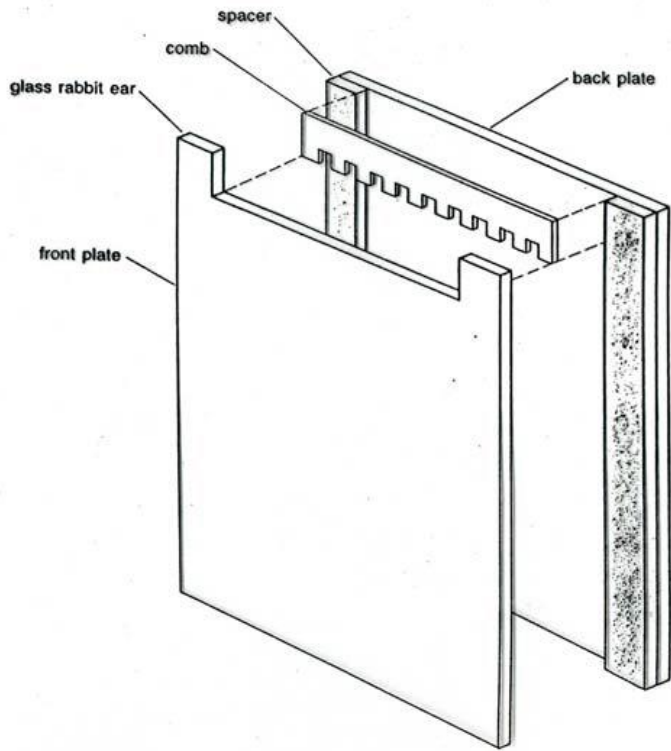
Elektroforetické pufry

- Elektroforetická mobilita DNA je ovlivněna složením a iontovou silou elektroforetického pufry
- V nepřítomnosti iontů je elektrická vodivost velmi nízká a DNA putuje velmi pomalu, proužky jsou rozmazané.
- TAE, TPE, **TBE** (tris-borát, kyselina boritá a EDTA)

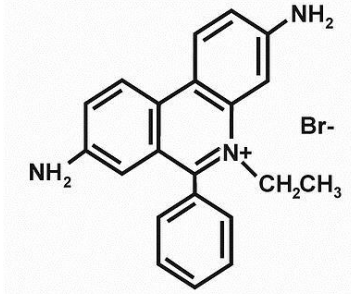
Horizontální gel



Vertikální gel



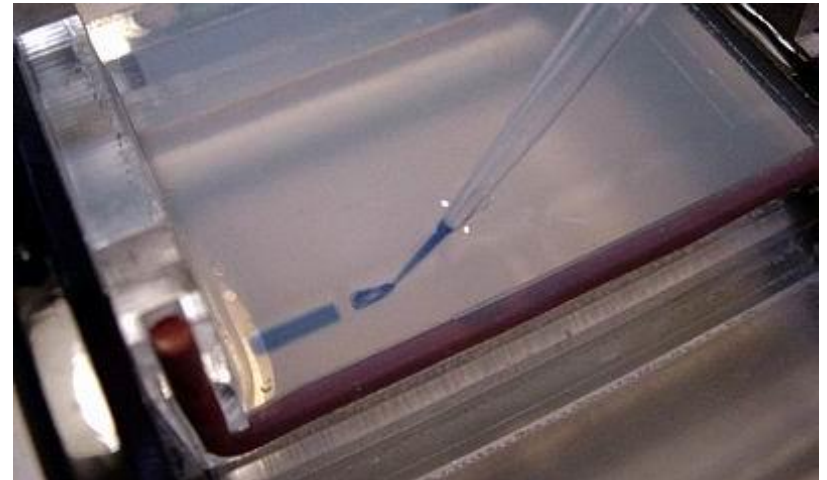
Barvení gelu



- Ethidiumbromid (2,7-diamino-10-ethyl-9-fenyl-fenanthridiniumbromid) - mutagen
- SYBR Green
- Barvení stříbrem – polyakrylamidové gely

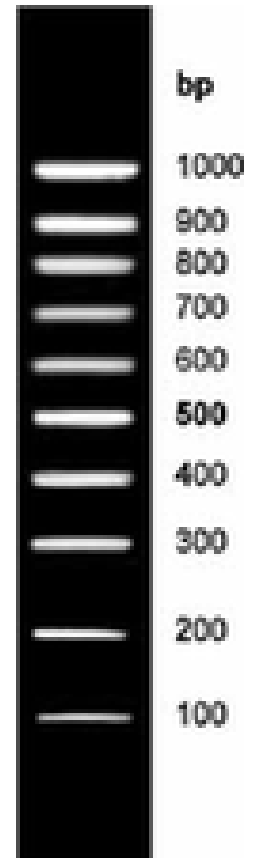
Nanášecí pufr

- Nanášecí pufry plní **tři role**:
 - 1) Zvyšují hustotu nanášeného vzorku, který ochotněji klesá ke dnu startu.
 - 2) Svou barvou usnadňují nanášecí proces.
 - 3) Během elektroforézy indikují přibližnou polohu jednotlivých fragmentů DNA.



Hmotnostní standard

- Nanáší se do jedné jamky gelu pro odhad velikosti pozorovaných DNA fragmentů
- Má definované velikosti jednotlivých fragmentů



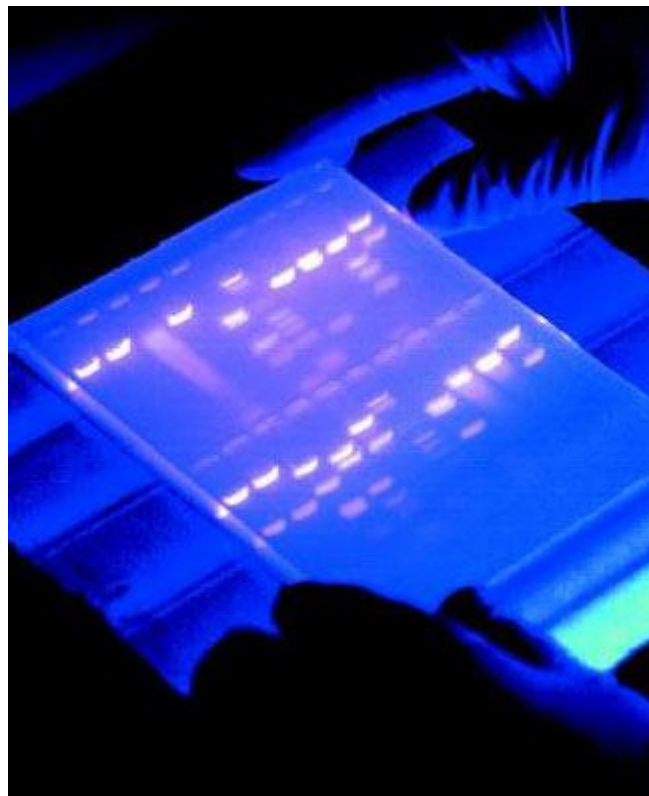
Příslušenství

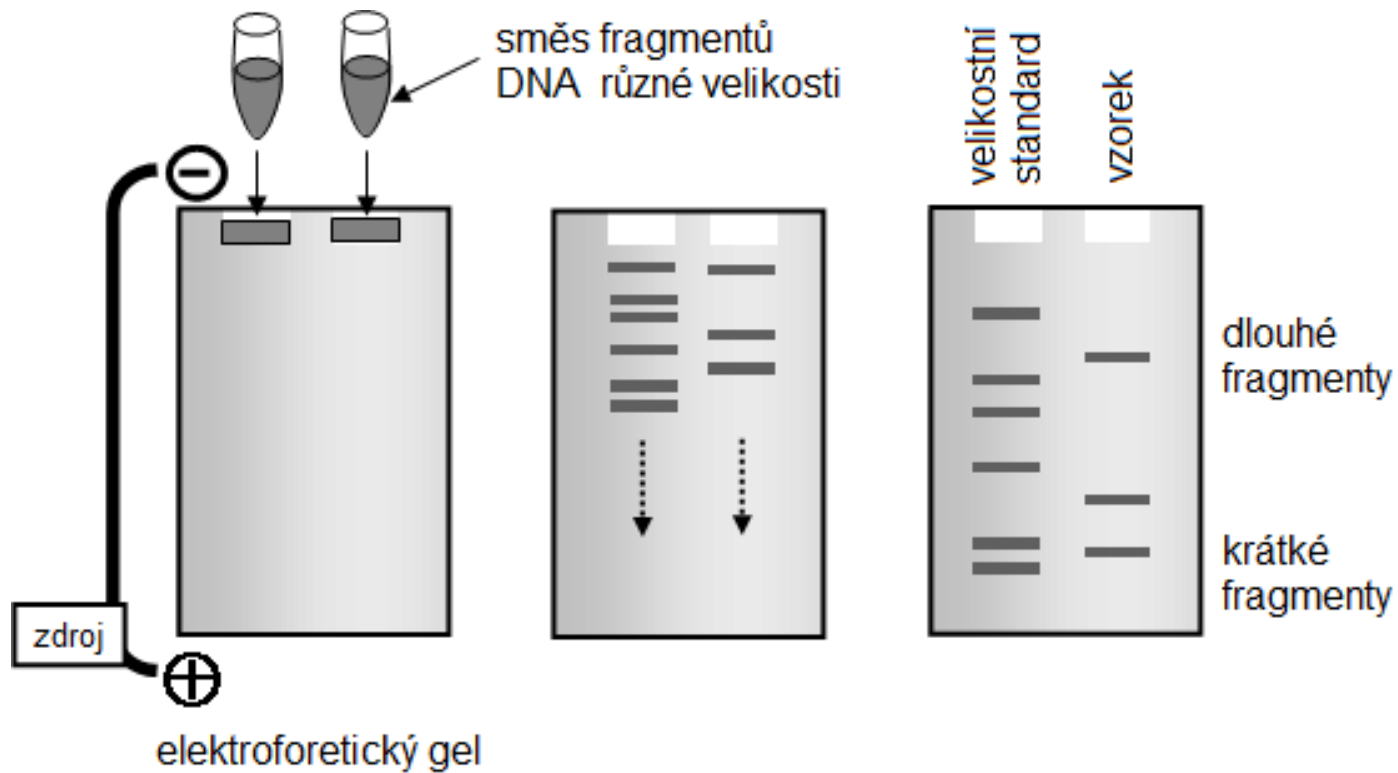


- K dosažení maximálního rozlišení fragmentů DNA větších než 2 kb, napětí by nemělo přesáhnout hodnotu 5 V/cm.

Zviditelnění gelu

- UV transiluminátor





Sekvenování

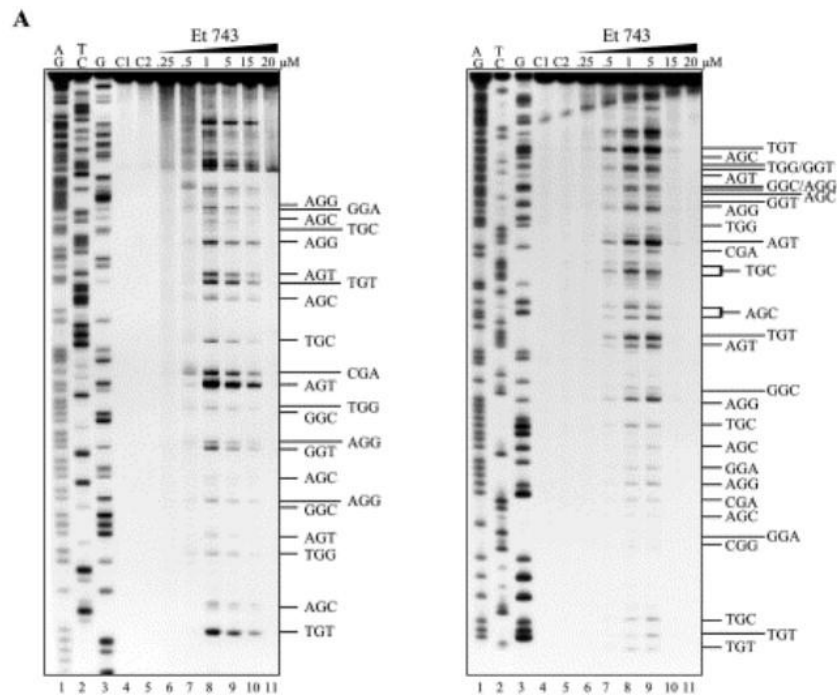
CGATTAAAGATAGAAATACACGATGCGAGCAATCAAATTCATAACCTCACCATGAGTTTGATCCGAAGCGATTAAAGATAGAAATACACGATGCGAGCAATCAAATTCATAACCTCACCATGAGTTTGATCCGAAG

- Cílem je stanovení primární struktury neboli pořadí nukleotidů v molekulách DNA
- Znalost sekvence DNA je rutinně používána pro odvození aminokyselinové sekvence
- Původně 2 metody: Maxam-Gilbertovo sekvenování a Sangerovo sekvenování
- Dnes již více metod-next generation sequencing

Maxamovo-Gilbertovo sekvenování

- Podstatou je specifické rozštěpení molekuly DNA **chemickými činidly** v místech, kde je lokalizovaná báze určitého typu
- Výchozí materiál-jednořetězcová DNA, označená na jednom konci **radioaktivní značkou**
- Podmínky reakce - modifikace pouze jedné báze v řetězci (dimethylsulfát, hydroxid sodný, hydrazin)
- Výsledkem modifikace je vytvoření **křehkého místa** v řetězci DNA, které je citlivé na štěpení
- Potom je DNA vystavena **piperidinu**, což vede k rozštěpení řetězce v zesláblých místech
- Odečtení sekvence v **denaturujícím polyakrylamidovém gelu**
- **Není rutinně používáno**-data nejednoznačná, vysoká úroveň radioaktivity

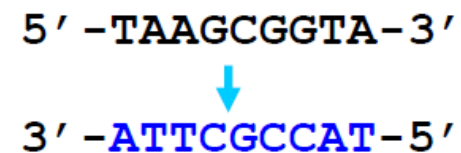
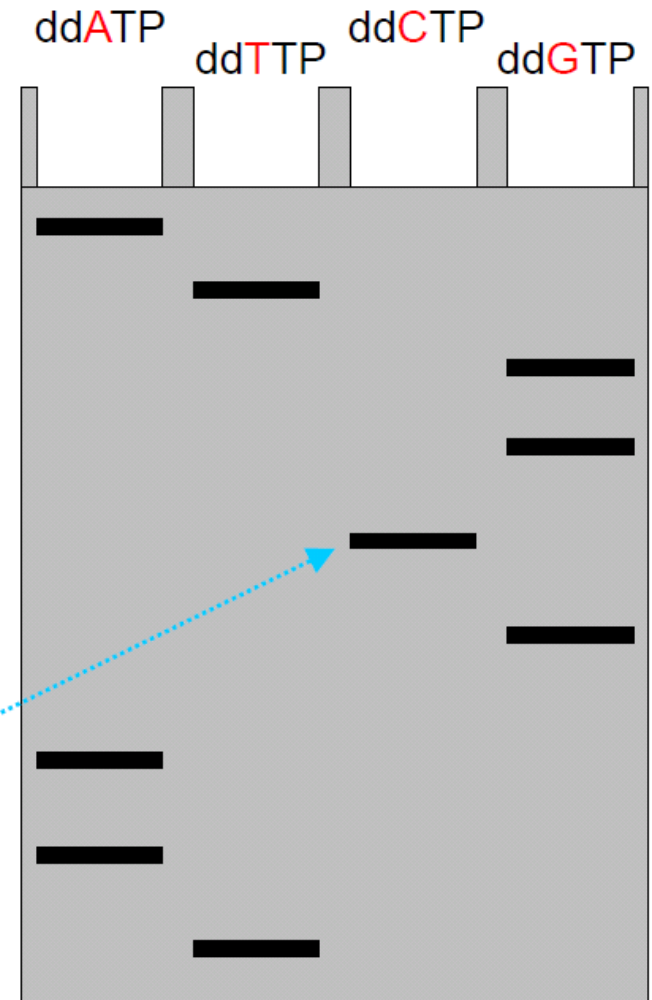
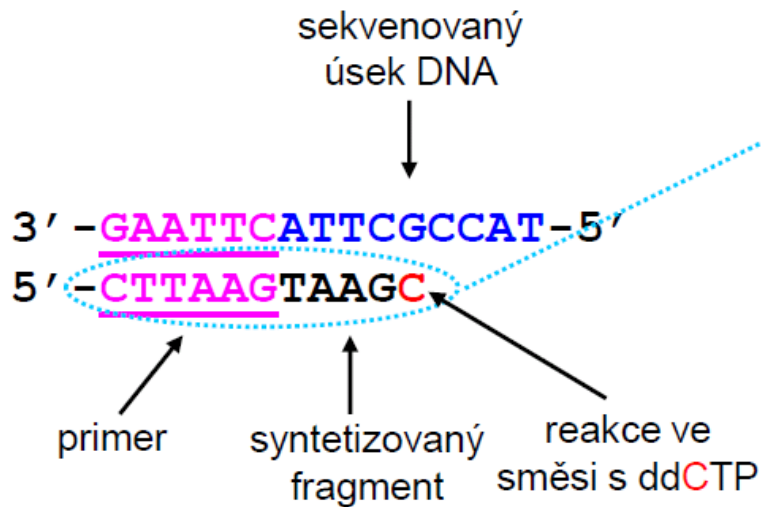
Maxamovo-Gilbertovo sekvenování



Sangerovo sekvenování

- Enzymová metoda
- Využívá biologického procesu replikace DNA s radioaktivně značenými 2',3'dideoxyribonukleosidtrifosfáty – inhibitor (terminátor) syntézy DNA
- Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu

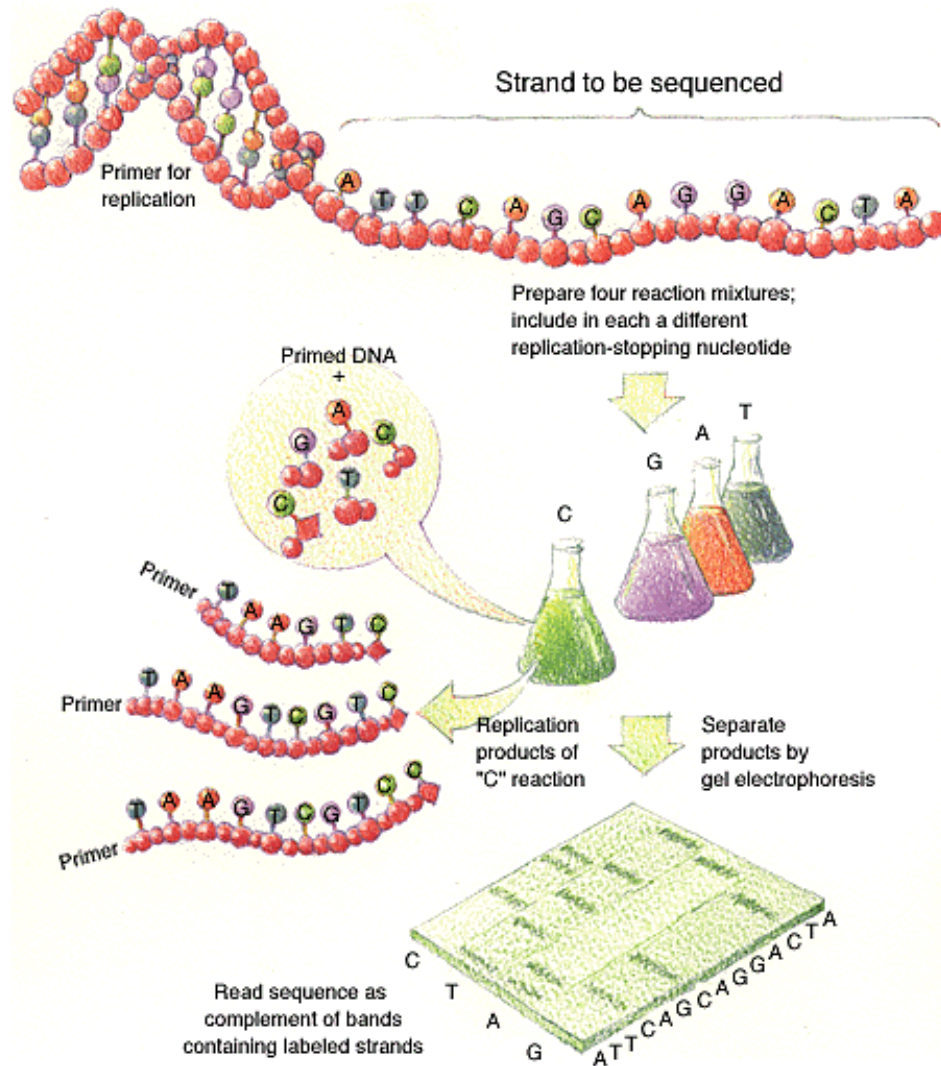
- DNA polymeráza při náhodném začlenění dideoxy analogu nemůže dále syntetizovat => vznik fragmentu
- separace těchto fragmentů na polyakrylamidovém gelu s následnou autoradiografickou detekcí



Sangerova metoda

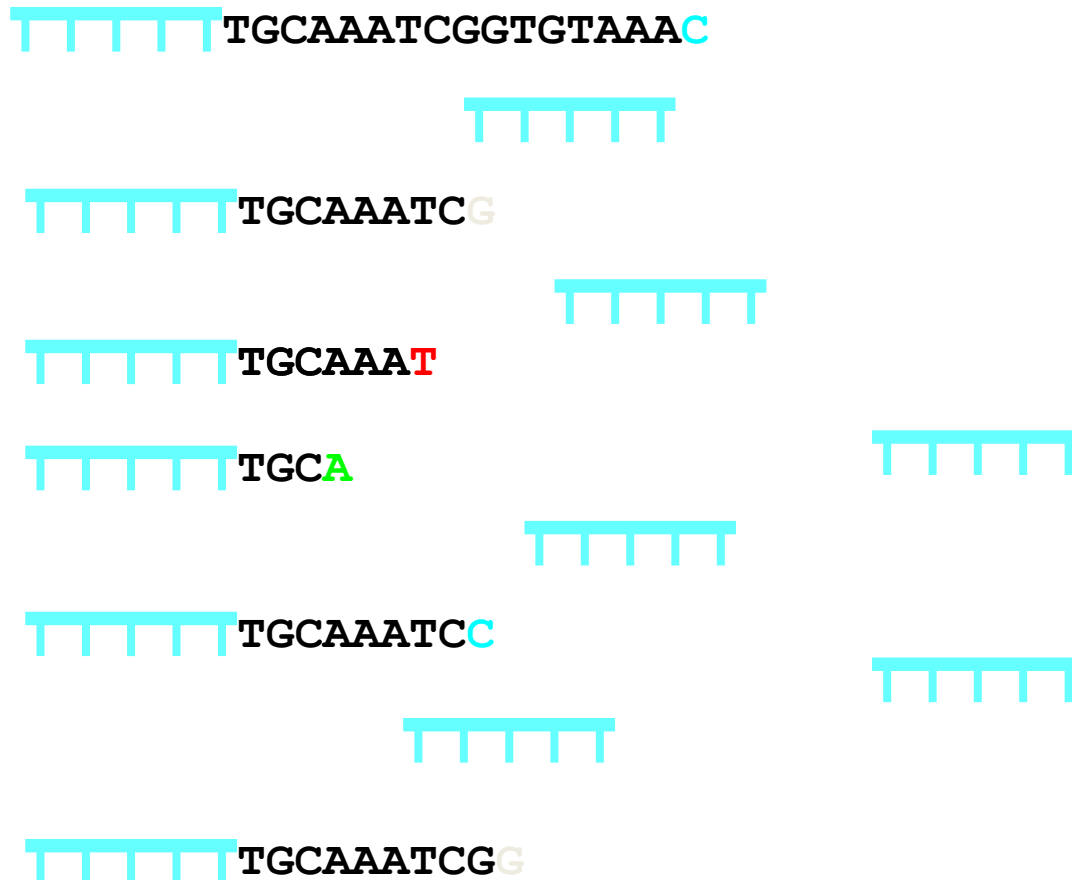
- místo radioaktivního značení (^{32}P) použita fluorescenční detekce
- dnes nejpoužívanější metoda
- reakční směs:
 - fluorescenčně značený primer (4 směsi => 4 značky)
 - DNA-polymeráza
 - 2'-deoxyribonukleosidtrifosfáty
 - jednotlivé směsi obsahují navíc příslušné 2',3'-dideoxyribonukleosidtrifosfáty (menší množství, asi 1%)

Sangerova metoda



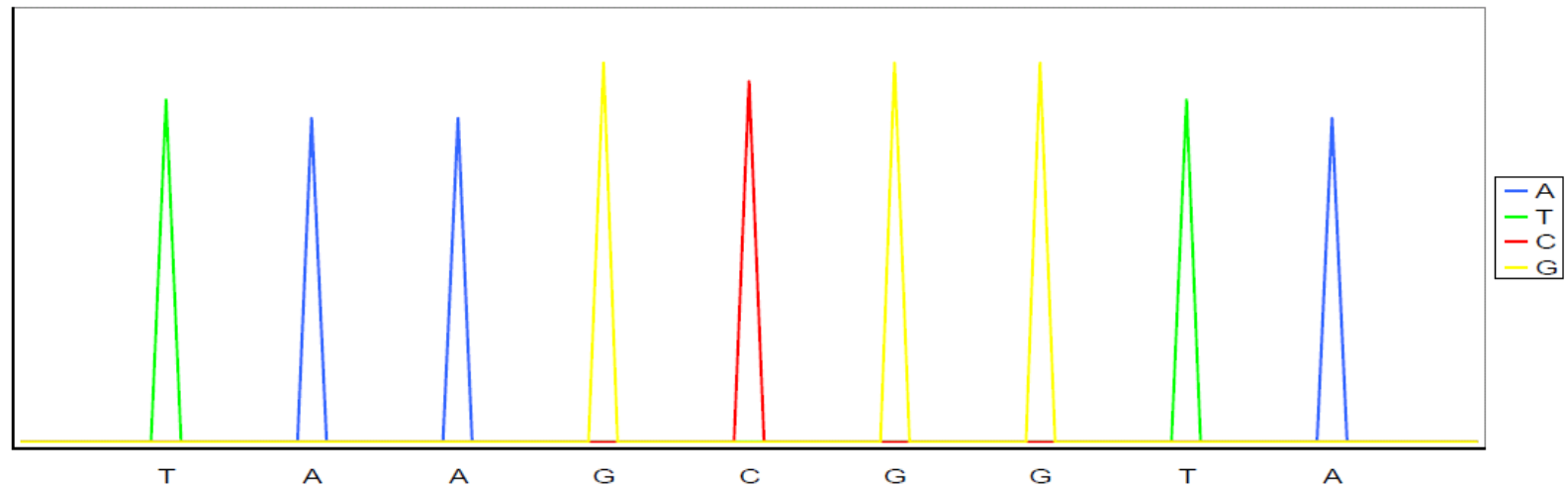
Automatická Sangerova metoda

- Využívá fluorescenčně značené terminátory



Automatická Sangerova metoda

- Separace jednotlivých fragmentů pomocí kapilární elektroforézy



Automatická Sangerova metoda

- Sekvenace jednotlivých DNA fragmentů.
Možnost paralelní sekvenace
- max. 96 sekvencí v jednom běhu (96 kapilárové sekvenátory)
- Délka získané sekvence cca 650 bp.
- Max. sekvenační výtěžek jednoho běhu cca 60 kb

Sekvenování nové generace

Sekvenování nové generace

- PCR se provádí paralelně pro všechny fragmenty DNA nebo není třeba.
- Paralelní sekvenování několika miliónů sekvencí.
- Délka získaných sekvencí cca 50 – 600 bp.
- Sekvenační výtěžek jednoho běhu několik až několik tisíc Gb (o 4 až 6 řádů vyšší než u kapilárního sekvenování).
- Cena sekvenace za bázi o řád až dva nižší než u kapilárního sekvenování.

- Poprvé v historii není problém data získat, ale smysluplně interpretovat

Obecné schéma celogenomového sekvenování

0. Izolace celogenomové DNA – získáme mnoho kopií genomové DNA
1. Příprava tzv. **knihovny** – fragmentace genomové DNA na fragmenty o délce řádově stovek bp dlouhé (ultrazvukem, proudem dusíku)
2. Zatupení konců a ligace pomocí tzv. **adaptérů** – krátkých oligonukleotidů, od kterých pak probíhá sekvenování jednotlivých fragmentů (vážou se k nim primery; všechny fragmenty se tedy sekvenují **stejným primerem**)
3. Namnožení klonů jednotlivých fragmentů
4. Vlastní sekvenování

NGS – nejčastější platformy

- 454 (Roche)
- Illumina
- Ion torrent (Life technologies)
- SOLiD (Life technologies)

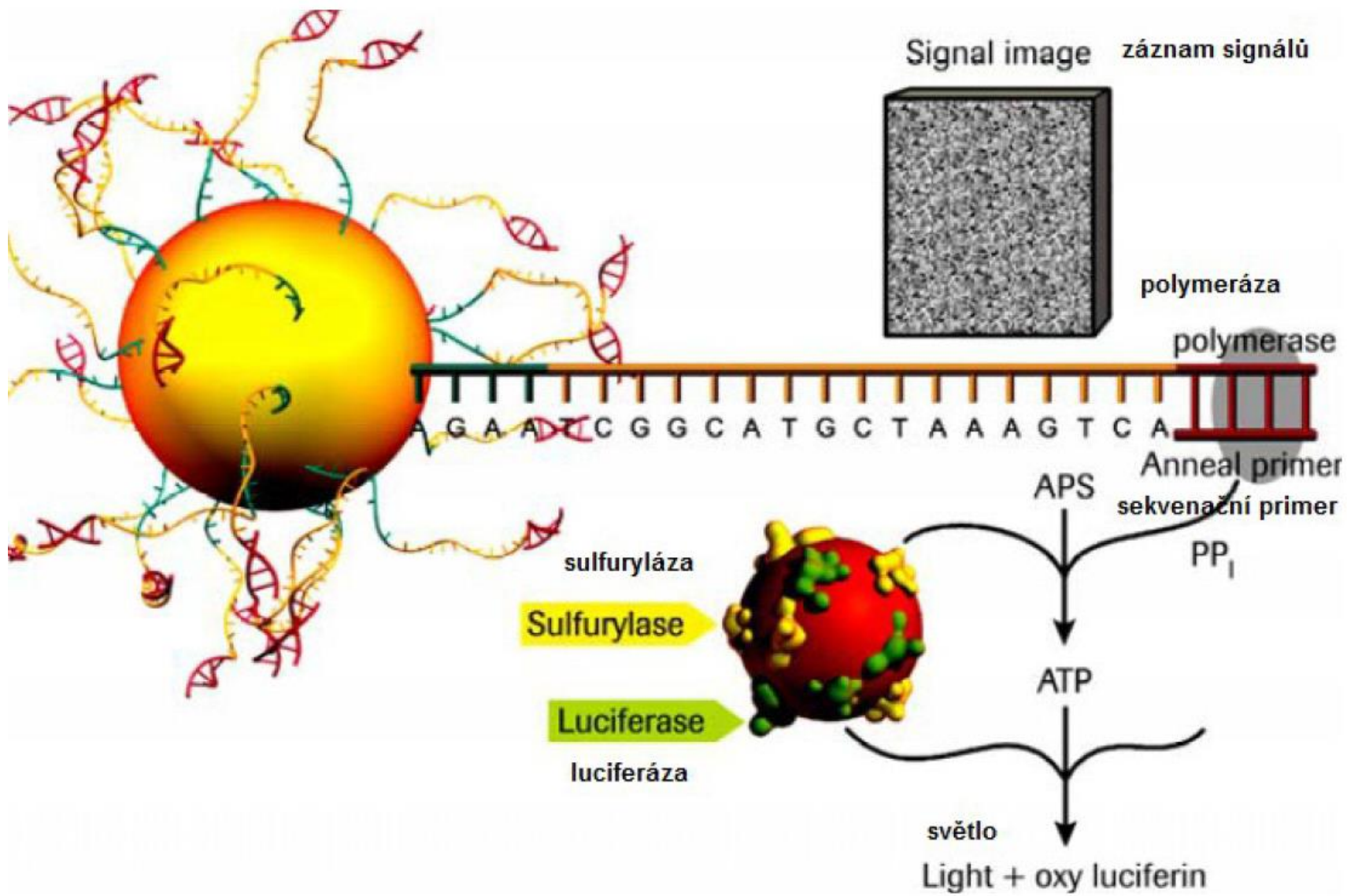
- Příprava knihovny
- Příprava vlastního templátu k sekvenování:
emulzní PCR na kuličkách, na každou kuličku se váže jeden fragment původní knihovny
- Po PCR na každé kuličce navázáno mnoho kopií příslušného fragmentu
- Sekvenace syntézou v mikrojamkách (v každé je jedna kulička)
- Detekce chemiluminiscenční - pyrosekvenování

Pyrosekvenování - 454

Pokud se začlení nukleotid do vznikajícího řetězce, poznáme to díky luminiscenci vyvolané sérií reakcí čtyř enzymů – DNA-polymeráza, ATP sulfuryláza, luciferáza, apyráza; směs dále obsahuje adenosin fosfosulfát (APS) a luciferin

Postup:

- 1) Přidáme ke kuličce roztok konkrétního nukleotidu
- 2) Pokud je **DNA polymerázou** začleněn do vznikajícího řetězce, uvolní se **pyrofosfát**
- 3) **ATP sulfuryláza** provede reakci pyrofosfátu s APS – vzniká **ATP**
- 4) **luciferáza** převede luciferin za přítomnosti ATP na **oxyluciferin**, uvolní se **světelné záření**, které je zachyceno detektorem, v počítači převedeno na informaci, který nukleotid byl inkorporován
- 5) **apyráza** rozloží neinkorporované nukleotidy a ATP (abychom „vyčistili stůl“ pro další reakci)
- 6) procesy 1-5 postupně opakujeme s dalšími dNTP (např. dCTP, pak dGTP, pak dTTP)



454 sekvenování



FLX System

- 1 million of reads/run
- 400-650 bp/read



GS Junior

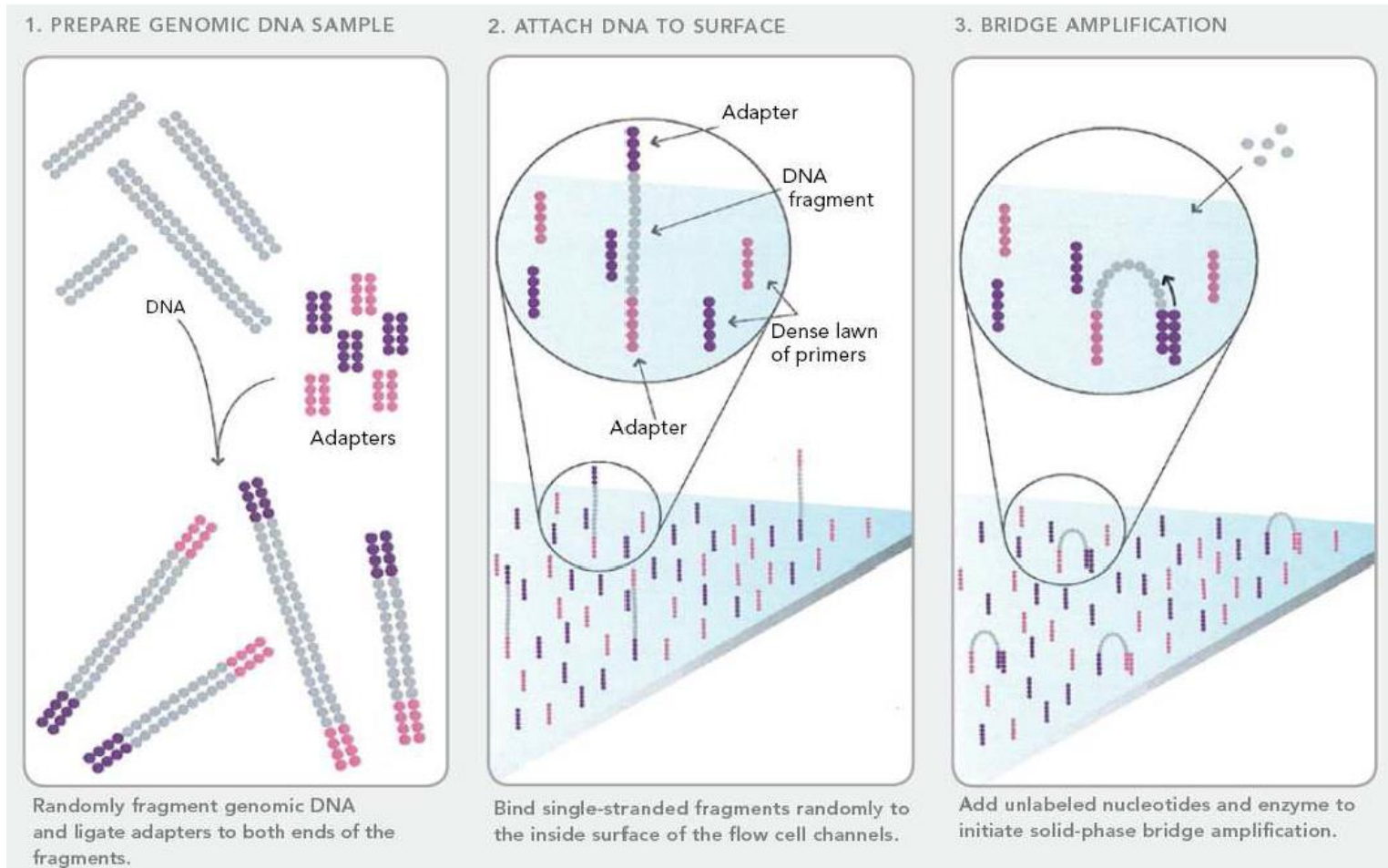
- 0.1 millions of reads/run
- 400 bp/read

SOLEXA (Illumina)

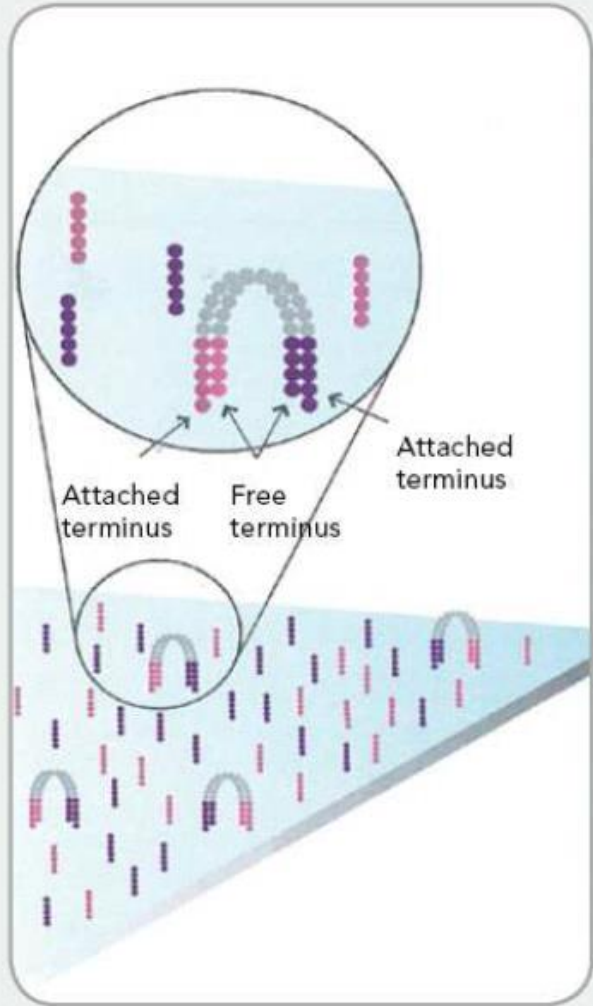
- Vzorek vložen do nebulizéru (vlivem stlačeného vzduchu se DNA rozbije na menší fragmenty)
- příprava templátu: **hybridizace na sklíčku**, tvorba clusterů (shluků) na pevné destičce, tj. ne v kapce (emulzi); každý cluster opět obsahuje klony (kopie) téhož fragmentu
- sekvenace syntézou (SBS – sequencing by synthesis)
- detekce fluorescence odštěpené značky z reverzního terminátoru (nukleotidu)
- Opět paralelní analýza mnoha clusterů současně

SOLEXA (Illumina) 2007

- můstková „bridge“ PCR

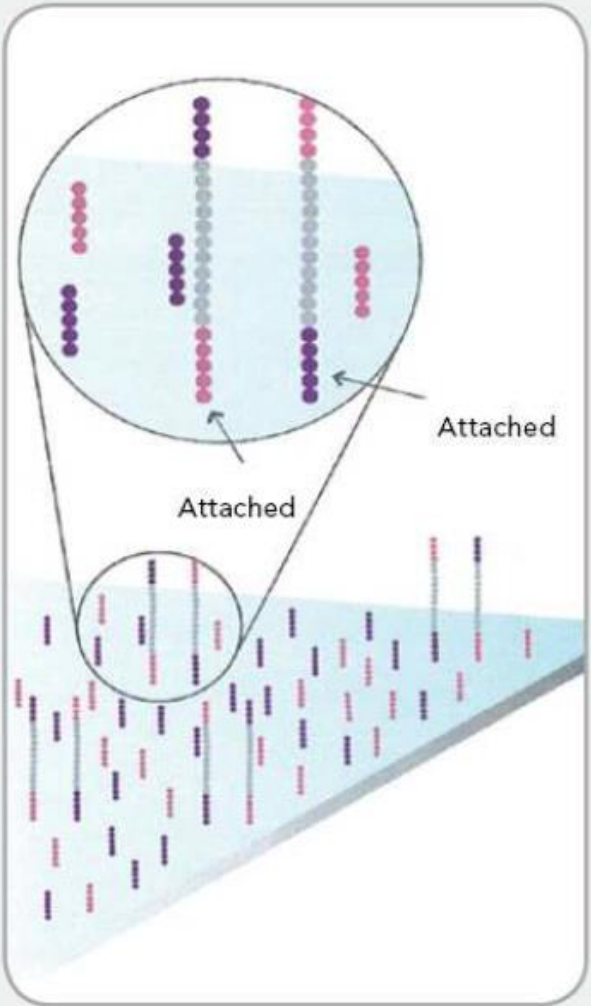


4. FRAGMENTS BECOME DOUBLE STRANDED



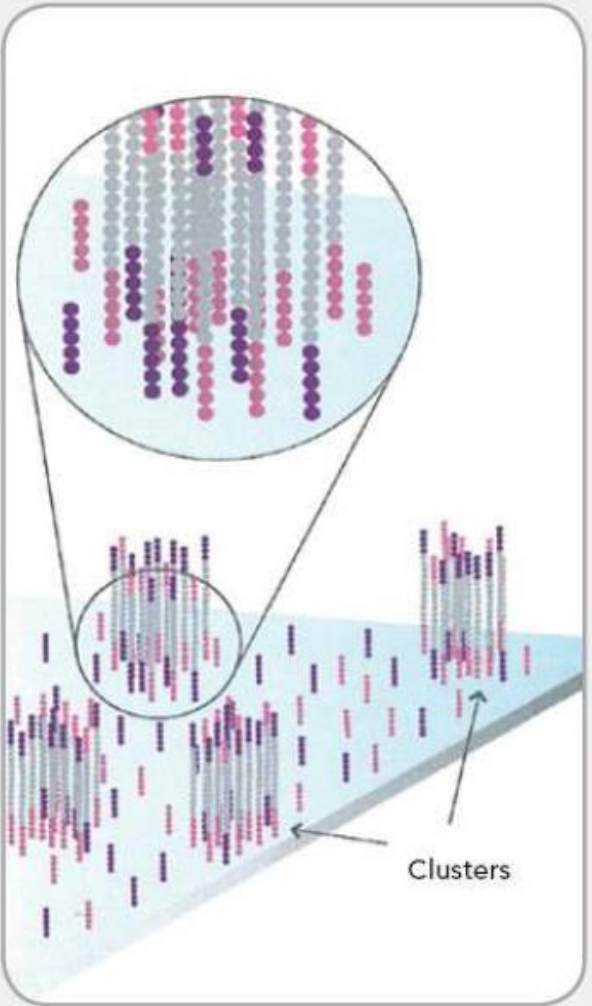
The enzyme incorporates nucleotides to build double-stranded bridges on the solid-phase substrate.

5. DENATURE THE DOUBLE-STRANDED MOLECULES



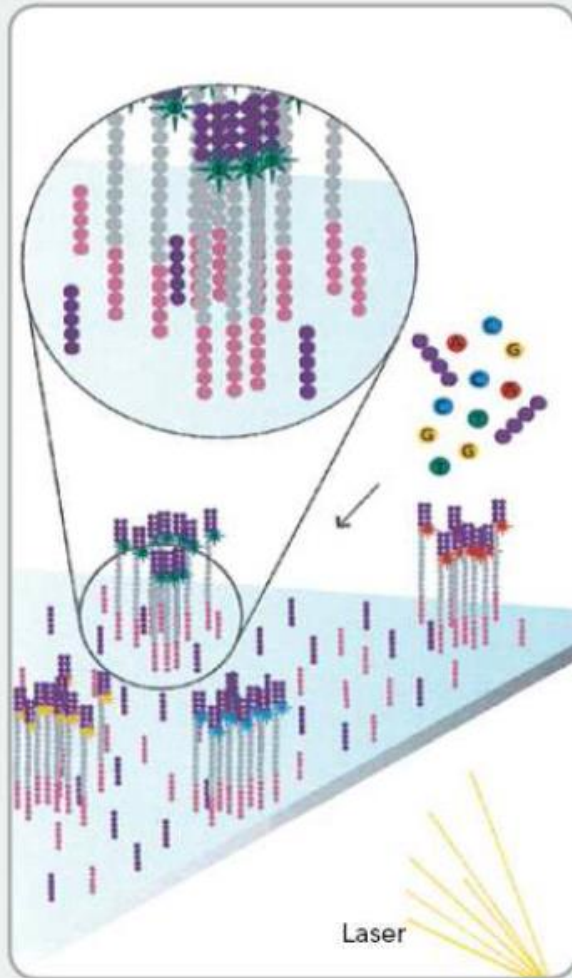
Denaturation leaves single-stranded templates anchored to the substrate.

6. COMPLETE AMPLIFICATION



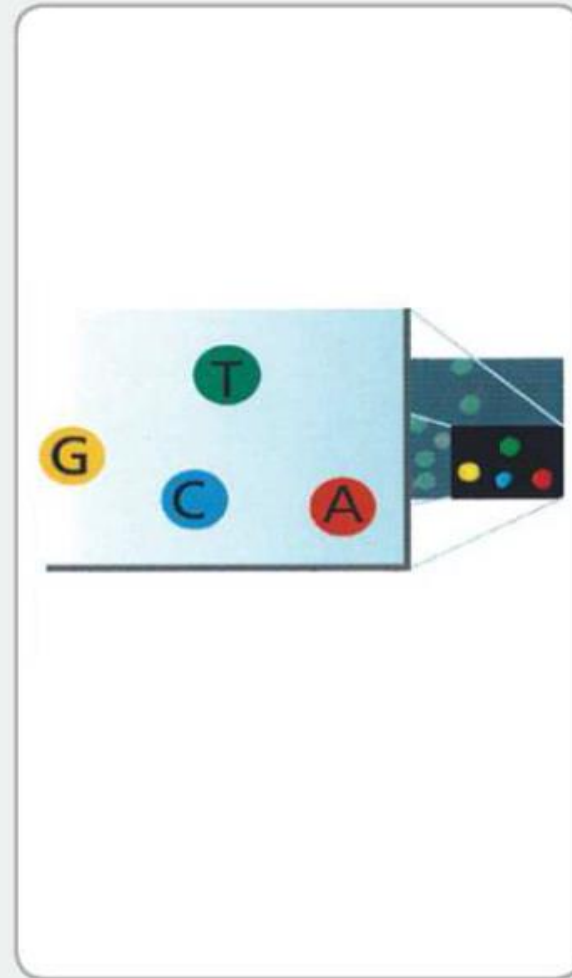
Several million dense clusters of double-stranded DNA are generated in each channel of the flow cell.

7. DETERMINE FIRST BASE



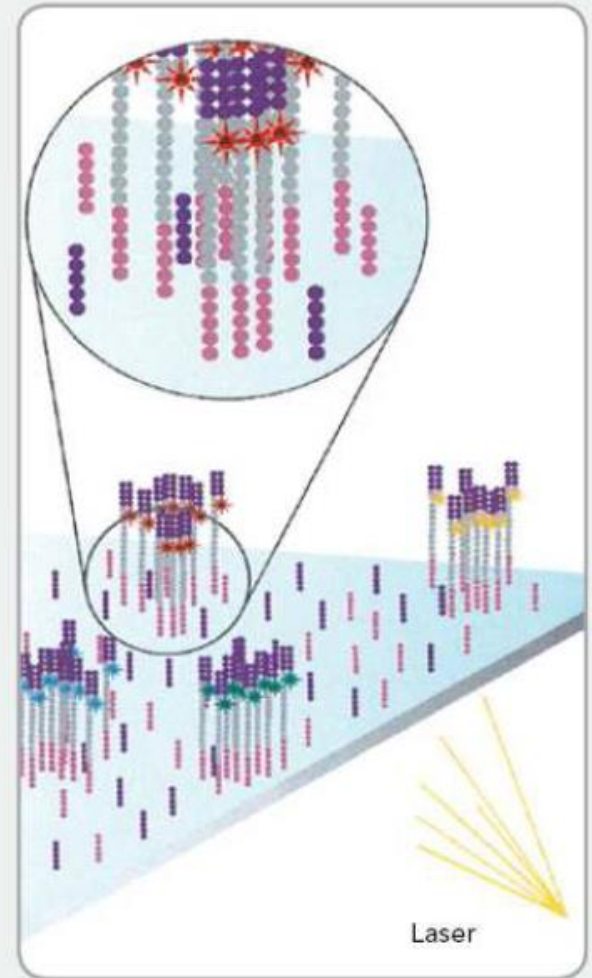
First chemistry cycle: to initiate the first sequencing cycle, add all four labeled reversible terminators, primers and DNA polymerase enzyme to the flow cell.

8. IMAGE FIRST BASE



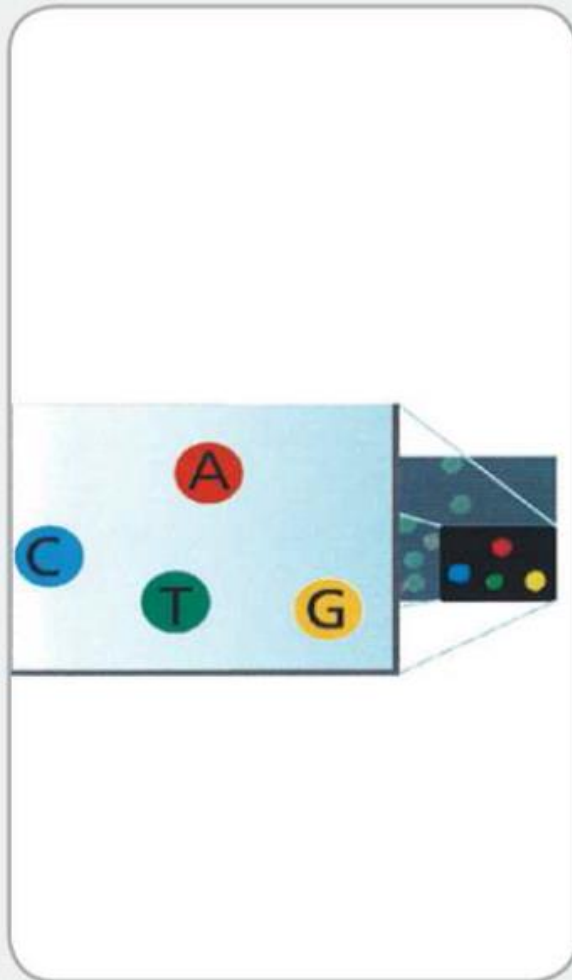
After laser excitation, capture the image of emitted fluorescence from each cluster on the flow cell. Record the identity of the first base for each cluster.

9. DETERMINE SECOND BASE



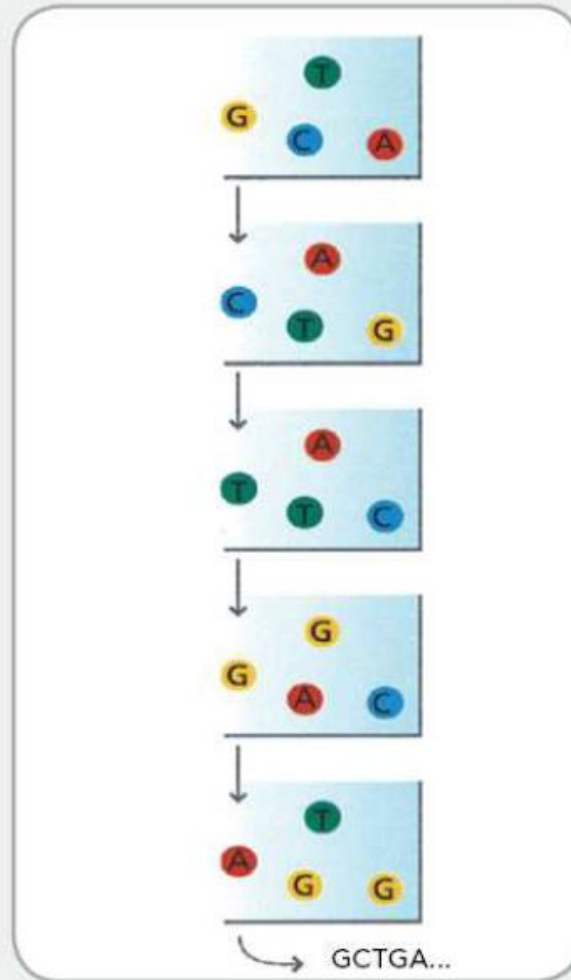
Second chemistry cycle: to initiate the next sequencing cycle, add all four labeled reversible terminators and enzyme to the flow cell.

10. IMAGE SECOND CHEMISTRY CYCLE



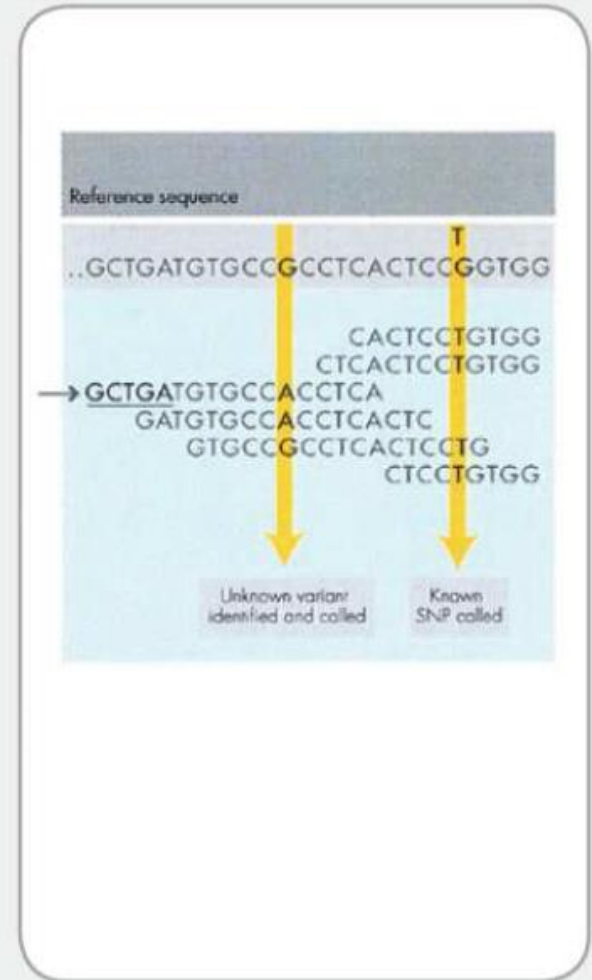
After laser excitation, collect the image data as before. Record the identity of the second base for each cluster.

11. SEQUENCE READS OVER MULTIPLE CHEMISTRY CYCLES



Repeat cycles of sequencing to determine the sequence of bases in a given fragment a single base at a time.

12. ALIGN DATA



Align data, compare to a reference, and identify sequence differences.

SOLEXA

Illumina sequencers

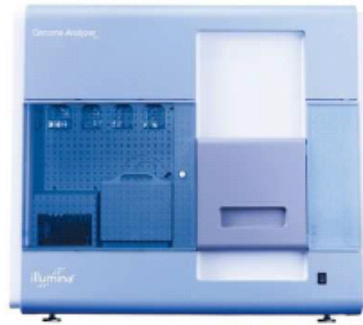
Illumina MiSeq

4 millions reads/run
150 bp/read



Illumina GAIIx

300 millions reads/run
150 bp/read



Illumina HighSeq

1500 – 3000 millions reads/run
100 bp/read



Next generation sequencing

SOLiD sequencers



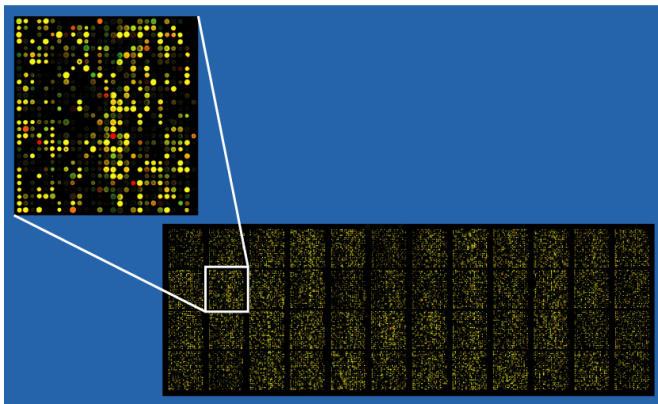
Ion Torrent



- SMRT (single-molecule real-time) sequencing (PacBio)
- minION (Oxford nanopore technologies)

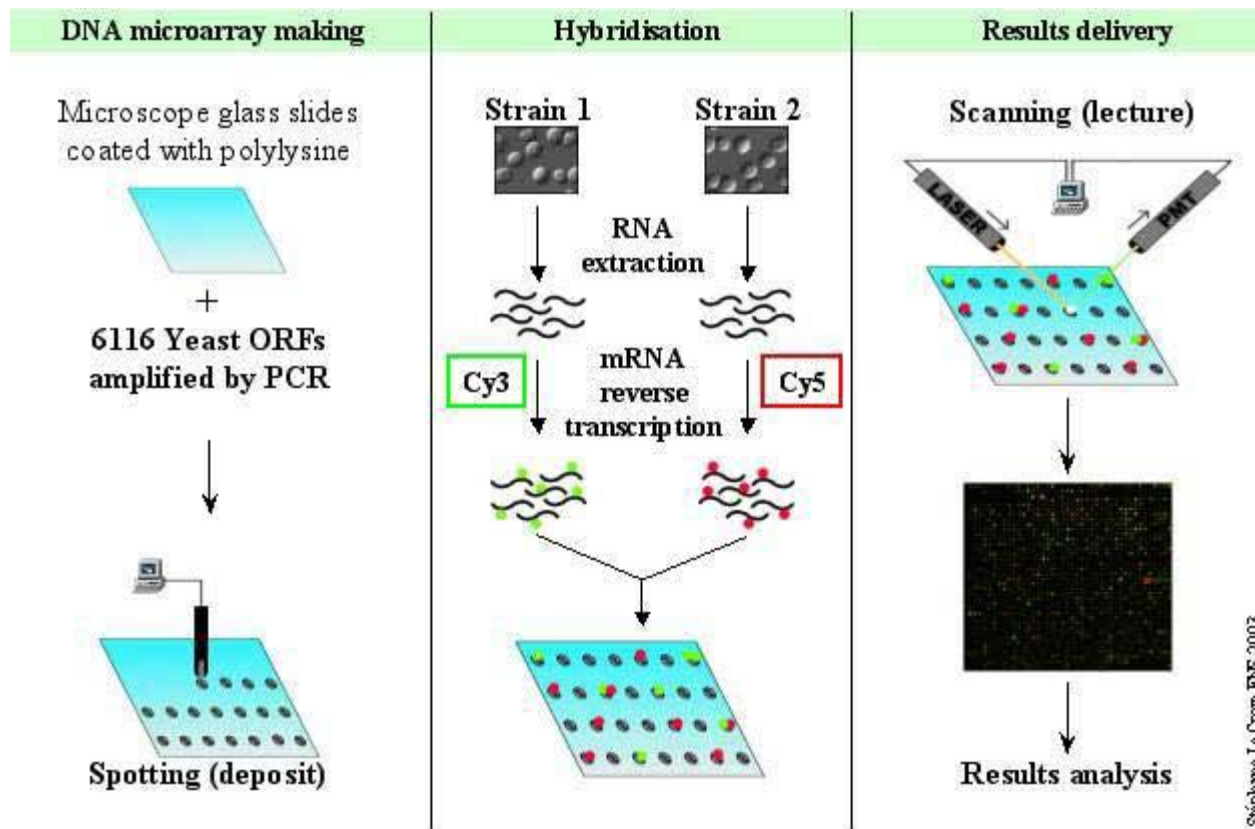
Microarrays

- Skleněná nebo silikonová destička s miliony jednořetězcových DNA oligonukleotidů
- PCR + Hybridizační reakce na čipu
- Affymetrix, Agilent Technologies, Eppendorf či Illumina



Princip Microarrays

- <https://www.youtube.com/watch?v=9U-9mlOzoZ8>



Využití čipů v mikrobiologii

- 12 virových agens způsobující onemocnění horních cest dýchacích
- Čipy na chřipku
- HPV čip
- Genotypizace HCV
- TruArray MRSA (Akonni)

Děkuji za pozornost

