

## ***Elektroforéza purifikovaných produktů PCR ze cvičení 2b*** **(cvičení č. 3a)**

### Úvodní slovo

Poznámky k agarózové elektroforéze jsou uvedeny ve cvičení č. 2a

### Cíl cvičení

**Srovnat čistotu PCR produktů před a po purifikaci, stanovit koncentraci purifikované DNA.**

### Seznam přístrojů

- pomůcky k elektroforéze podle cvičení č. 2a
- UV spektrofotometr Nanodrop
- pikofuga na 1,5 ml mikrozkušavky s otáčkami do 6 000 rpm

### Vlastní pracovní postup

#### **Elektroforéza a odhad koncentrace**

- 1) Provedeme elektroforézu malého množství PCR produktu ze cvičení 2b.
- 2) Paralelně stanovíme koncentraci a čistotu DNA v nanášených vzorcích pomocí UV spektrofotometru Nanodrop. Detaily k měření koncentrace a čistoty DNA spektrofotometricky Vám sdělí vyučující. Postup si následně zopakujete i ve cvičení 4b.
- 3) V protokolu ze cvičení použijete v příloze fotografii gelu. Popíšete výsledky elektroforézy a zjištěné koncentrace PCR produktů.

POZOR: Koncentraci DNA lze odhadnout i na agarózovém gelu pomocí tzv. kvantifikačních standardů. To jsou sériově naředěné směsi různě dlouhých fragmentů dsDNA o známé koncentraci. Odhad koncentrace se provádí porovnáním intenzity fluorescence fragmentu kvantifikačního standardu s intenzitou fluorescence purifikovaného PCR produktu. Hodnota je ovšem velmi orientační a nelze jí nahradit spektrofotometrií nebo fluorometrií. Nicméně v některých případech může být pro další manipulace s DNA dostačující.

### Další informace k této problematice najdete v následující literatuře

**Sambrook, J. a Russell, D. 2001:** Molecular cloning. A laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press

## **Analýza výsledku sekvenování (cvičení č. 3b)**

### Úvodní slovo

Toto cvičení je přímým pokračováním cvičení č. 1. Pro rodové/druhovému zařazení může postačovat sekvence části genu pro 16S rRNA. Ověření a přesnější klasifikace lze dosáhnout porovnáním sekvencí více genů v databázi. Pro účely klasifikace použitého mikroorganismu jsme zvolili kromě genu pro 16S rRNA i druhý gen, jehož sekvence je specifická pro daný bakteriální kmen.

Sekvenování se provádí z jednoho z primerů pro amplifikaci genu nebo lze navrhnout vhodnou sekvenci uvnitř amplikonu.

Pro porovnávání námi získaných sekvencí s celosvětovou databází použijeme algoritmus BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), který je v současnosti asi nejrozšířenějším heuristickým algoritmem, jenž umožňuje prohledávat rozsáhlé databáze. Pro účely srovnávání nukleotidových DNA sekvencí bakterií je nejvhodnější využít databáze BLASTN. Po seznámení se s vzhledem příslušných www stránek zvolíme nastavení default, je ale možné zvolit vlastní parametry prohledávání.

### Cíl cvičení

**Analyzovat výsledky sekvenování**

### Seznam přístrojů

Toto je teoretické cvičení, potřebovat budete vlastní notebooky s wi-fi připojením k internetu a staženými volně dostupnými programy **WinZip** (<https://www.winzip.com/win/en/winzip-10.html>) a **BioEdit** (<https://bioedit.software.informer.com/7.2/>), záznamy o sekvenování (sekvenování provedla společnost GATC Eurofins), a výsledné protokoly.

### Vlastní pracovní postup

- 1) Stáhněte si dle pokynů vyučujícího v elektronické formě soubory s výsledky sekvencí (formát .zip nebo .rar), soubory rozbalte pomocí programu WinZip a jednotlivé sekvence si prohlédněte v programu BioEdit.**
- 2) Při kontrole kvality sekvencí postupujte podle pokynů vyučujícího a dělejte si poznámky.**
- 3) Zkontrolujte a opravte sekvence:**
  - A) Prohlédněte si záznamy sekvencí jednotlivých genů a vyhledejte ty nukleotidy, které nejsou dobře čitelné.
  - B) Opravte v záznamu software neurčené nukleotidy, případně vyřadte ty, které jsou nečitelné.
  - C) Lze ze záznamu zjistit, kde se vázal sekvenační primer?
  - D) Zkontrolujte, jak dlouhý je získaný sekvenační záznam oproti délce amplikonu.
  - E) Vyznačte v sekvenci celistvý úsek, který už po opravě neobsahuje žádné nečitelné nebo špatně čitelné nukleotidy.

**4) Prohledejte databázi a zařadte výsledky**

- F) Vyhledejte prohlédavač označovaný jako BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Celý proces přirovnání sekvencí Vám nejprve popíše a názorně ukáže vyučující. Postup následně zopakujete individuálně s vlastními sekvencemi 16S rRNA genu.
- G) Vložte sekvenci celistvého úseku do prohlédavače.
- H) Vyčkejte, až program provede porovnání vaší sekvence s databází.
- I) Odečtěte výsledek a zaznamenejte nejpravděpodobnější zařazení rodu a druhu mikroorganismu.
- J) Klikněte na odkaz s Accession kódem sekvence s nejvyšší shodou, který propojuje BLAST službu s NCBI nukleotidovou databází. Vyexportujte sekvenci 16S rRNA genu ve formátu FASTA a v programu BioEdit ji srovnajte pomocí lokálního a globálního přirovnání (Local vs. Global Alignment) s Vaší sekvencí ze sekvenace. Postupujte podle pokynů vyučujícího. Postup si zapisujte.
- K) Odpovězte na následující otázky: Jak velký je celý gen 16S rRNA a kterou jeho část jsme amplifikovali pomocí PCR. Jak velká je shoda (%) Vaší sekvence s celým genem 16S rRNA. Pozorujete rozdíly mezi výsledky lokálního a globálního přirovnání? Popište je. Jaký typ přirovnání je v tomto případě vhodnější a proč?
- L) Pro přesnou identifikaci kmene bakterie použijeme výsledky ze sekvenace neznámého specifického genu. Sekvenci přirovnáme pomocí algoritmu nBLAST ve speciální databázi, jejíž fungování Vám popíše vyučující.
- M) Na základě přirovnání sekvence neznámého genu popište nejpravděpodobnější druh a kmen bakterie, ze které gen pochází. Odpovězte na následující otázky: Jakému genu patří amplifikovaná sekvence. Jaké jsou jeho koordináty v genomu identifikované bakterie? Jaká je funkce produktu genu a kde se v bakterii nachází? Zjištění si zapište do protokolu ze cvičení.

Další informace k této problematice najdete v následující literatuře

**Cvrčková, F. 2006:** Úvod do praktické bioinformatiky. Academia, Praha.

**Šmarda et al. 2005:** Metody molekulární biologie, Masarykova Universita, Brno

**Simmon K.E., Croft A.C., Petti C.A. 2006:** Application of SmartGene IDNS Software to Partial 16S rRNA Gene Sequences for a Diverse Group of Bacteria in a Clinical Laboratory. *Journal of Clinical Microbiology* 44(12), 4400-4406.

**Winsor G.L., Griffiths E.J., Lo R., Dhillon B.K., Shay J.A., Brinkman F.S. 2016:** Enhanced annotations and features for comparing thousands of *Pseudomonas* genomes in the *Pseudomonas* genome database. *Nucleic Acids Res.* doi: 10.1093/nar/gkv1227