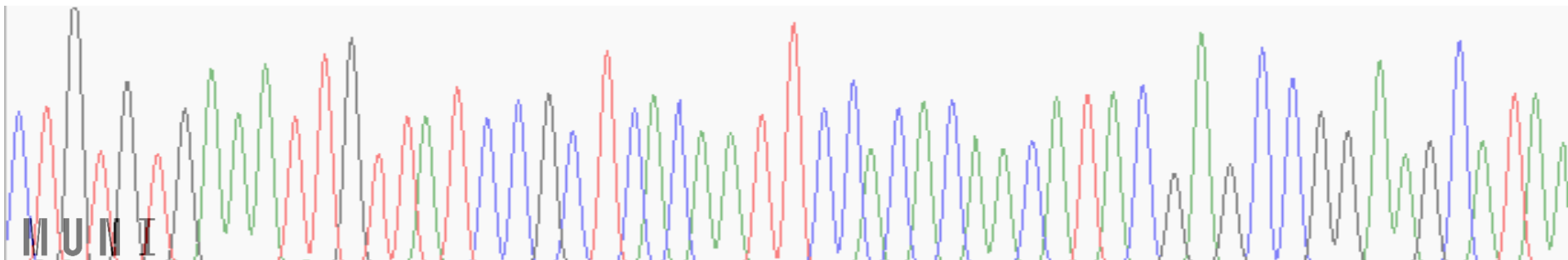


Cvičení č. 3

Analýza výsledků sekvenace

Přírodovědecká fakulta MUNI



CO NÁS DNES ČEKÁ...

- 1) Elektroforéza (ne)purifikovaných produktů PCR
- 2) Teoretický úvod k enzymové metodě sekvenování
- 3) Seznámení se s protokolem
- 4) Analýza získaných sekvencí dle protokolu
- 5) Příklady a diskuse

METODY SEKVENOVÁNÍ NK

- **Chemická metoda** (Maxamovo-Gilbertovo sekvenování)
- **Enzymová metoda** (Sangerovo sekvenování)
- **Pyrosekvenování**
- **Next generation sequencing (NGS)**

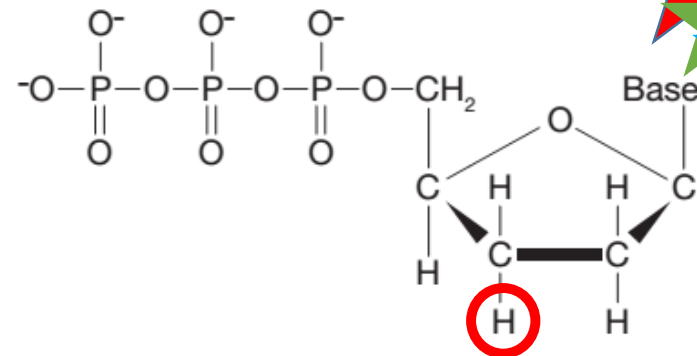
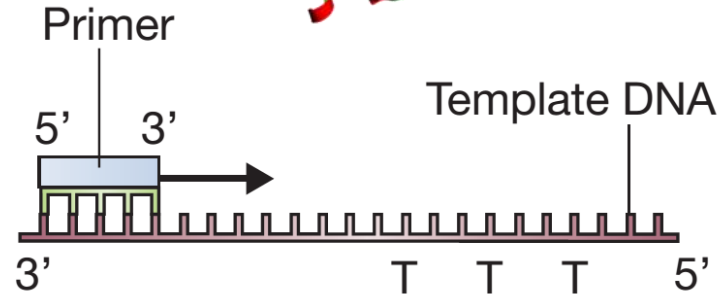
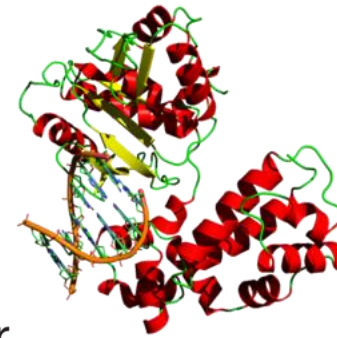
METODY SEKVENOVÁNÍ NK – CO MAJÍ SPOLEČNÉHO

- Stanovuje se sekvence **restrikčních fragmentů** klonovaných ve vektorech nebo sekvence **PCR produktu**
- Jeden **konec fragmentu musí být definován**
- Musí být vytvořen **soubor ssDNA molekul**, které se liší délkou o jeden nk
- Pro **rozdělení fragmentů** nutná metoda s dostatečnou rozlišovací schopností

ENZYMOVÁ METODA (SANGEROVO SEKVENOVÁNÍ)

Využívá 5 základních komponent

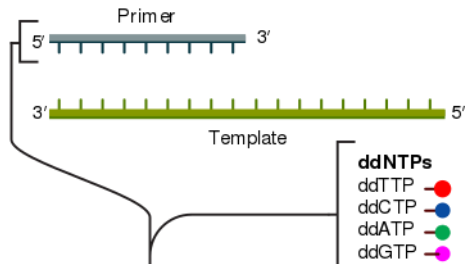
- Templátovou DNA molekulu
- DNA primer
- DNA polymerázu
- Normální dNTPs
- **Modifikované ddNTPs = dideoxyterminátory**



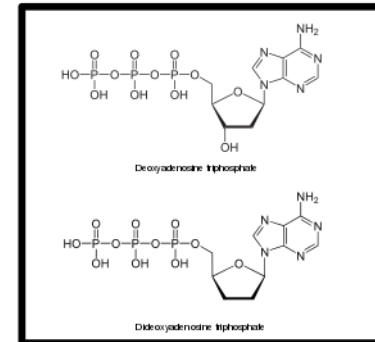
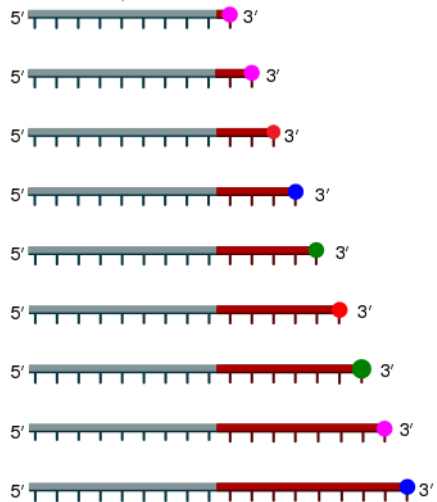
ENZYMOVÁ METODA: PŘEHLED

① Reaction mixture

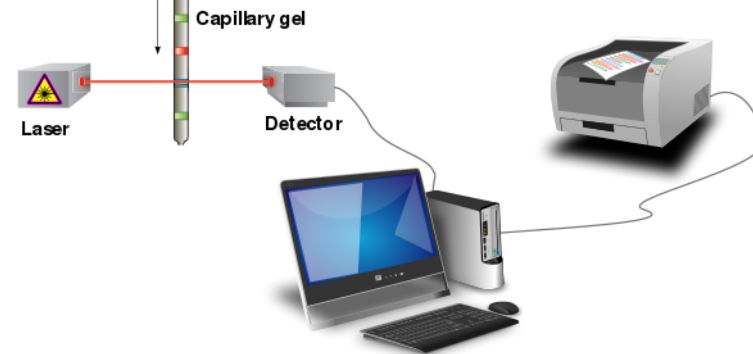
- ▶ Primer and DNA template
- ▶ DNA polymerase
- ▶ ddNTPs with flouochromes
- ▶ dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, and dTTP)



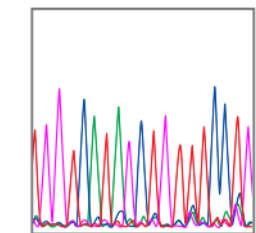
② Primer elongation and chain termination



③ Capillary gel electrophoresis separation of DNA fragments



④ Laser detection of flouochromes and computational sequence analysis



chromatogram

<https://en.wikipedia.org>

ENZYMOVÁ METODA: PRŮBĚH

1. denaturace (92-96°C)



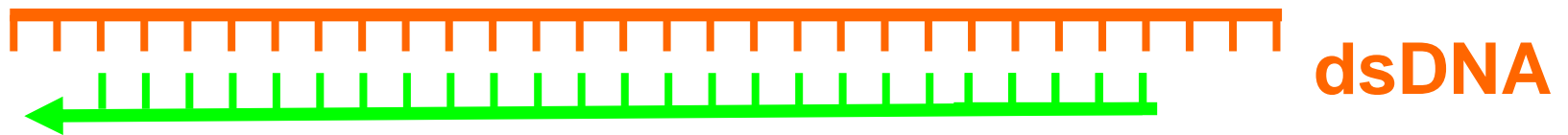
2. annealing (45-72°C)

3. extenze (72°C)



ENZYMOVÁ METODA: PRŮBĚH

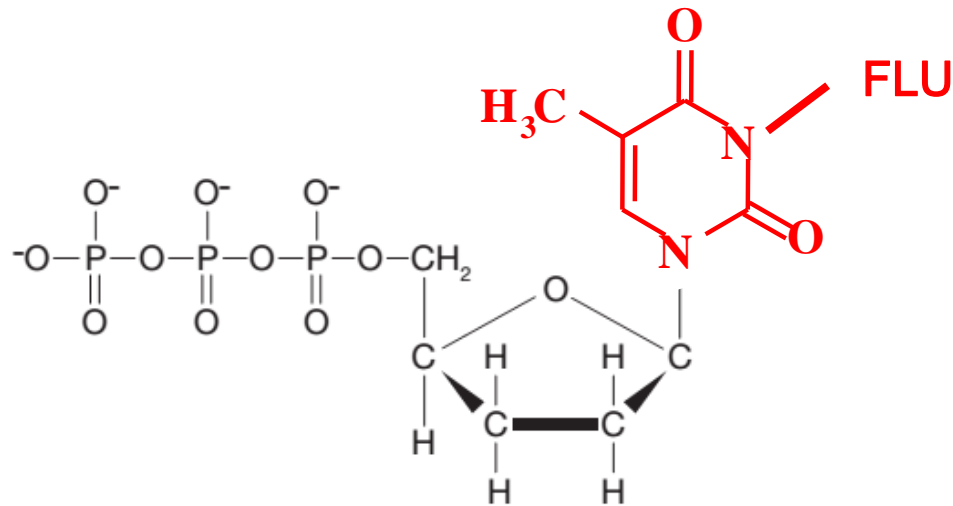
1. denaturace (92-96°C)



2. annealing (45-72°C)

3. extenze (72°C)

ENZYMOVÁ METODA: PRŮBĚH



TTTTT TGCAAATCGGTGTAAACGGT

TTTTT TGCAAATCGGTGT

TTTTT TGCAAATCGGT

TTTTT TGCAAAT

ATGCTACGTTTAGGCACATTTGCCATATGAACCT



ENZYMOVÁ METODA: PRŮBĚH

TTTTT TGCAAATCGGTGTA
TTTTT TGCAA
TTTTT TGCA
TTTTT TGC

ATGCTACGTTTAGGCACATTTGCCATATGAACCT



TTTTT TGCAAATCGGTGTAAAC
TTTTT TGCAAATC
TTTTT TGCAAATC
TTTTT TGC

ATGCTACGTTTAGGCACATTTGCCATATGAACCT

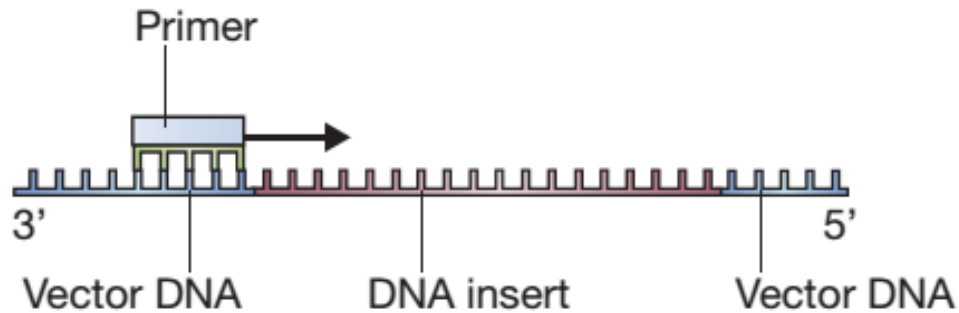


ENZYMOVÁ METODA: DNA POLYMERÁZA

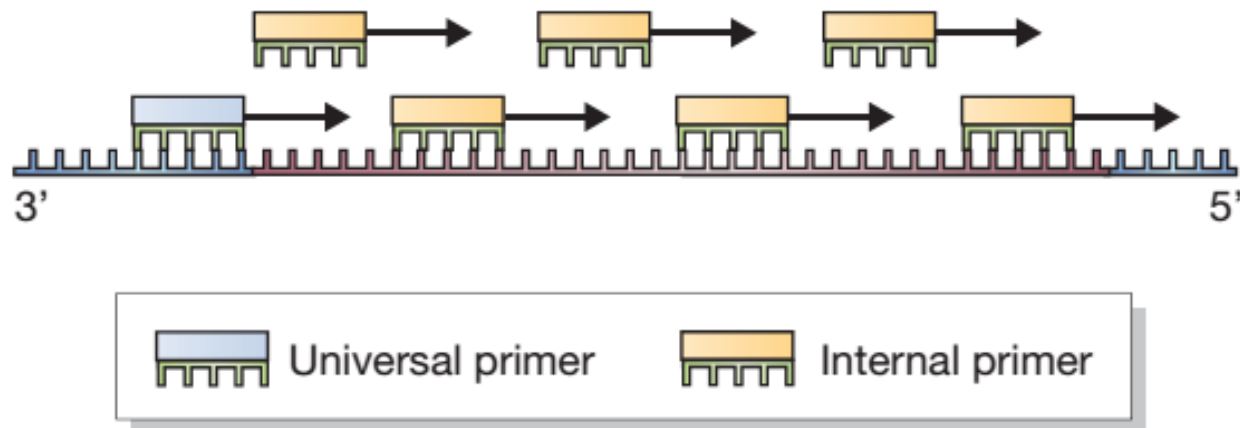
- Ne všechny DNA polymerázy vhodné pro sekvenační reakci
- **5'→3'** stejně jako **3'→5'** degradační aktivita je **nevhodná**
- Původně využíván **Klenowův fragment** (DNA pol. I z *E. coli* bez 5'→3' exonukleázové aktivity)
- Dnes komerční enzymy jako **Sequenase** (DNA pol. z bakteriofága T7, ↑ procesivita)

ENZYMOVÁ METODA: PRIMER(Y)

(a) A universal primer

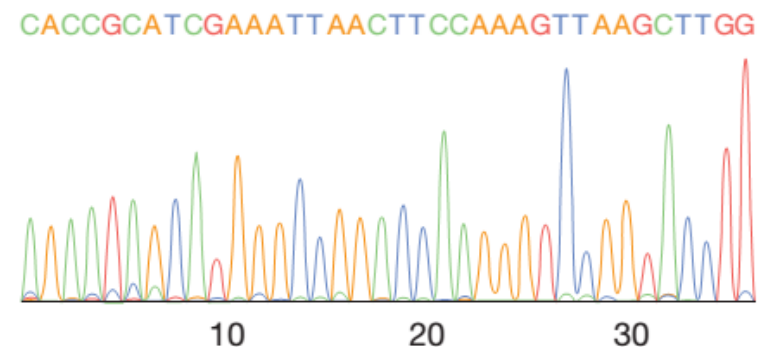


(b) Internal primers



ENZYMOVÁ METODA: GRAN FINALE

- získáme tedy směs DNA molekul o různé délce
- Každá ma na konci značený ddNTP
- Nyní přichází na řadu **polyakrylamidový gel** (dnes v kapilárním formátu)
- Vysoká rozlišovací schopnost na úrovni 1 nt
- Po ELFO procházejí molekuly detektorem fluorescence
- Výsledkem je **chromatogram**



PRAKTICKÝ ÚKOL

ANALÝZA SEKVENCÍ PCR PRODUKTŮ Z PRVNÍHO CVIČENÍ!

