

Úloha č. 5

Určení bakterie rodu *Borrelia* pomocí DNA sekvenace

ÚVOD

Pod pojmem sekvenování DNA nebo také „čtení“ DNA se rozumí určení přesného pořadí neboli sekvence jednotlivých nukleotidových bází (resp. nukleotidů) v úseku DNA. Provádí se nejčastěji na principu **Sangerovy metody** nebo nověji pomocí **cyklického sekvenování na termocykléru**. Základem obou metod je amplifikace (namnožení) vlákna DNA, jehož sekvenci chceme znát.

Sangerova metoda využívá schopnosti enzymu DNA polymerázy stavět k tzv. templátovému vláknu komplementární řetězec DNA. Nezbytná je přítomnost vhodného oligonukleotidového primeru jako základu nového vlákna DNA a čtyř typů **2', 3'-dideoxyribonukleosidtrifosfátů ddNTP** (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP), kterým chybí na 3' uhlíku ribosy hydroxylová skupina. Díky tomu již nemůže DNA polymeráza při syntéze nového vlákna na tento konec navázat žádný další nukleotid a růst tohoto řetězce se zastaví. Pokaždé tedy, když polymeráza začlení určitý dNTP (např. dATP deoxyadenosintrifosfát) do rostoucího řetězce, je určitá pravděpodobnost, že místo dATP využije ddATP (2', 3'-dideoxyadenosintrifosfát) a v tom případě polymerace končí. Pokud reakce probíhá dostatečně dlouho, získáme tak různě dlouhé oligonukleotidy, které budou všechny končit adeninem. Toto platí analogicky i pro zbývající dNTP/ddNTP. Po skončení reakce je možné výsledné produkty (kterými jsou různě dlouhé úseky DNA) rozdělit v gelu a zjistit tak délku nově vzniklého řetězce, přičemž délka odpovídá počtu bází od 5'-konce nového řetězce až do místa, kde se vyskytl ddNTP (v našem případě ddATP).

Moderní sekvenování je již plně automatizováno. Sekvenační reakce, kdy dochází k začleňování dNTP a ddNTP a syntéze nového vlákna, probíhá v termocykléru také pomocí DNA polymerázy. Vyhodnocení výsledných produktů provádí přístroje sekvenátory, které pracují na principu kapilární gelové elektroforézy. ddNTP použité v sekvenační reakci jsou značeny různými fluorescenčními barvivy (pro každou bázi je jiná barva). Výslednou sekvenci DNA pak sekvenátor určuje na základě tohoto barevného značení, a to na principu laserové detekce emise fluorescenčních barev pomocí fotonásobiče a velmi citlivého detektoru přímo z gelu.

Význam sekvenování: sekvenování DNA se využívá například ve výzkumu biologických procesů, dále třeba v aplikovaných oborech, jimiž jsou diagnostika nemocí či forenzní medicína. Sekvenování se uplatnilo také v projektu čtení lidského genomu (Human Genome Project), ale přečteny byly genomy i jiných organismů, včetně různých rostlin, živočichů a mikrobů. Někdy se sekvenují pouze určité části genomu, které mají pro výzkum v daném okamžiku význam.

PRACOVNÍ POSTUP

I. Přečištění amplifikované DNA pomocí ExoSAP

Materiál: Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP), Exonuclease I *E.coli* (Exo), DNA, pipety, špičky, popisovače, mikrozkušavky (0,2 ml), termocyklér

Jedná se o purifikaci PCR produktů pomocí enzymů exonukleázy I a alkalické fosfatázy, které odstraňují nezreagované primery.

Do zkumavky napipetujte následující reagenty, zkumavku krátce promíchejte na vortexu a stočte, poté vložte do termocykléru.

Reakční směs pro přečištění (7 μ l/vzorek):

SAP.....	1,0 μ l
Exo.....	0,5 μ l
<hr/>	
*DNA.....	5,5 μ l

*DNA – PCR produkty po 1. PCR, resp. po 2. PCR

Teplotní protokol pro přečištění:

37 °C 15 min

80 °C 15 min

10 °C hold

II. Sekvenační reakce

Materiál: BigDye Terminator v3.1. Cycle Sequencing Kit, pipety, špičky, popisovače, mikrozkušavky (0,2 ml), termocyklér, primer, PCR voda, DNA

Základní složky sekvenačního mixu:

DNA polymerasa

deoxyribonukleosidtrifosfáty (dATP, dCTP, dTTP, dGTP)

2',3'-dideoxyribonukleosidtrifosfáty (ddATP, ddCTP, ddTTP, ddGTP)

Do zkumavky napipetujte následující reagenty, zkumavku krátce promíchejte na vortexu a stočte, poté vložte do termocykléru.

Reakční směs pro sekvenační reakci (10 µl/vzorek):

sekvenační mix	2,0 µl
sekvenační pufr	2,0 µl
primer	0,6 µl
PCR voda.....	2,4 µl
<hr/>	
*DNA.....	3,0 µl

Teplotní protokol pro sekvenační reakci:

96 °C – 1 min

35x | 96 °C – 10 sek (denaturace)
| 50 °C – 5 sek (annealing)
| 60 °C – 4 min (extenze)

10 °C – hold

III. Přečištění po sekvenační reakci

Materiál: Chemagic SEQ Pure Kit, magnetický stojan, pipety, špičky, popisovače, mikrozkušavky (1,5 ml), vodní lázeň, PCR voda, DNA

DNA je v tomto kroku přečištěna pomocí magnetických kuliček, které pomáhají odstranit nezreagované primery a dNTP/ddNTP, které by negativně ovlivňovaly vyhodnocení výsledků.

1. Do zkumavky napipetujte 10 µl promíchaných (!) magnetických částic, přidejte 10 µl DNA a 150 µl Vazebného pufru 1 a směs pipetou promíchejte (5x).
2. Inkubujte 2 min při pokojové teplotě.
3. Po inkubaci separujte magnetické částice umístěním zkumavky do magnetického stojánu. Počkejte, než se částice k magnetu přitáhnou, odsajte supernatant a poté oddělte zkumavku z magnetu.
4. Přidejte 100 µl Promývacího pufru 2, důkladně rozsuspendujte částice propipetováním (5x) a vložte zkumavku do magnetického stojánu.
5. Inkubujte 2 min při pokojové teplotě.
6. Odsajte supernatant.
7. Promyjte částice ještě jednou 100 µl Promývacího pufru 2, nechte stát 2 min, poté vložte do magnetického stojánu.
8. Úplně odstraňte supernatant.

9. Oddělte zkumavku z magnetického stojánku a nechte částice vysušit zhruba 10 min při pokojové teplotě. K částicím přidejte 20 µl vody (nechte protéct přes kuličky) a pipetou směs rozsuspendujte.
10. Nechte stát 5 min při pokojové teplotě a občas promíchejte (zhruba po 2 minutách), aby se DNA lépe uvolnila.
11. Po eluci separujte magnetické částice vložáním zkumavky na 2 min do magnetického stojánku.
12. Přeneste eluát obsahující purifikovanou DNA do nové zkumavky a stočte.
13. Nechte denaturovat 2 min při 95 °C.
14. Hned poté zchlaďte v mrazáku cca 1 min a stočte.

IV. Analýza na sekvenátoru ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer

Vzorky napipetujte do destičky na sekvenaci a spusťte sekvenátor.

Pro analýzu použijeme programy 3130 Data Collection v3.0 a Sequencing Analysis 5.3.1.

V. Vyhodnocení výsledků

Pro vyhodnocení výsledných sekvencí použijeme program Sequence Scanner v1.0.

Vyhodnocené sekvence se poté zkopírují do databáze BLAST (dostupné na internetu)

1. Webová stránka <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
2. Basic BLAST - zvolte program nucleotide BLAST
3. Enter Query Sequence – vložte sekvenci
4. Choose Search Set - zatrhněte Others (nr etc.)
5. Klikněte na „BLAST“

Ve výsledné tabulce najdete podle parametru Max indent druh borrelie, který se nejvíce shoduje s analyzovanou sekvencí (čím více procent, tím lépe). Pokud by se v procentech shodovaly dvě a více sekvencí, vyberete tu s vyšším skóre.