



Sekvenování nukleových kyselin a analýza DNA sekvencí

doc. RNDr. Milan Bartoš, Ph.D.

bartosm@vfu.cz

Přírodovědecká fakulta MU, 2014

Obsah přednášky

- 1) Pojem sekvenování**
- 2) Maxamovo-Gilbertovo sekvenování**
- 3) Sangerova metoda s využitím fluoroforů**
- 4) Pyrosekvenování**
- 5) Nové přístupy k sekvenování**
- 6) Příklad reálné analýzy**



Doporučená literatura

www.farmakogenomika.cz

Sekvenování

Rozhodující metoda pro stanovení nukleotidových sekvencí

- **Konečná fáze procesu individualizace jednotlivých izolátů**
- **Metoda je pro většinu mikrobiologických aplikací příliš přesná**

Metody sekvenování nukleových kyselin

Chemická metoda sekvenování
(Maxamovo-Gilbertovo sekvenování)

Enzymová metoda sekvenování
(Sangerovo sekvenování)

Pyrosekvenování

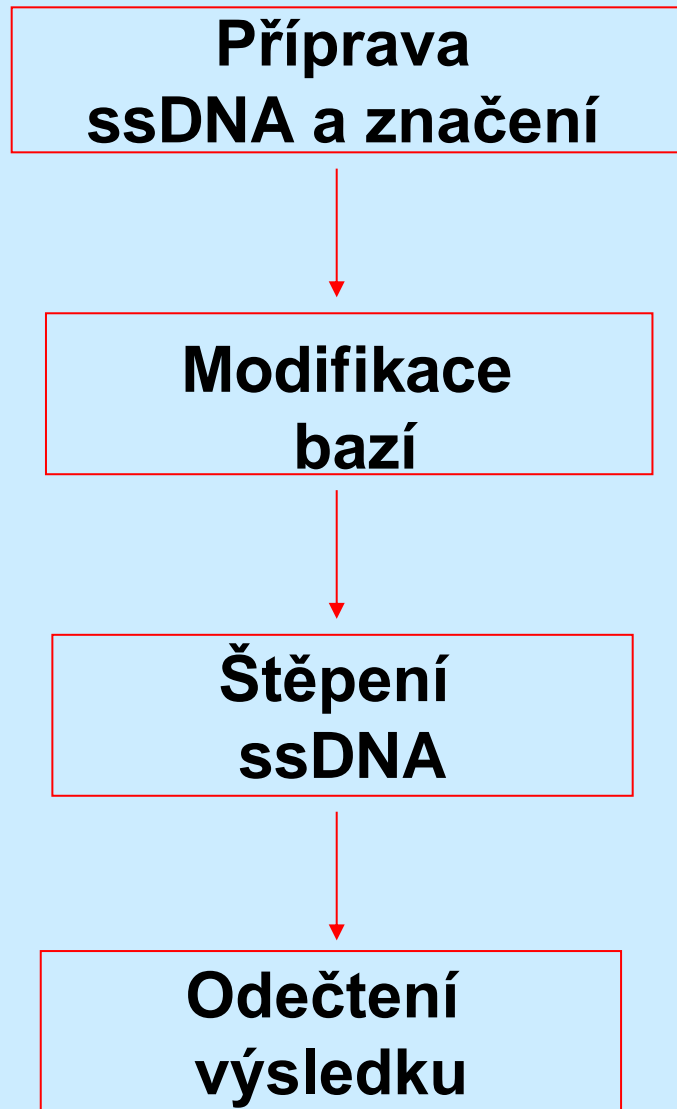
Chemická metoda sekvenování ***(Maxamovo-Gilbertovo sekvenování)***

Podstatou je specifické štěpení molekuly **ssDNA** po modifikaci jednotlivých bází chemickými činidly s následnou elektroforetickou detekcí v denaturujícím polyakrylamidovém gelu.

Chemická činidla jsou **specifická** pro modifikaci určitých bází:

G	– DMS
A+G	– piperidin
C+T	– hydrazin
C	– hydrazin + NaCl

Chemická metoda sekvenování



Chemická metoda sekvenování

Příprava
ssDNA a značení

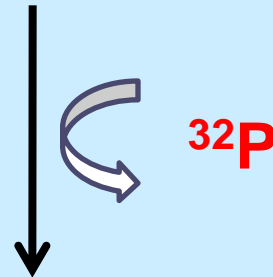


Modifikace
bází

Asymetrická PCR

Využití vazby
biotinylovaného primeru

Štěpení
ssDNA



Odečtení
výsledku



Chemická metoda sekvenování

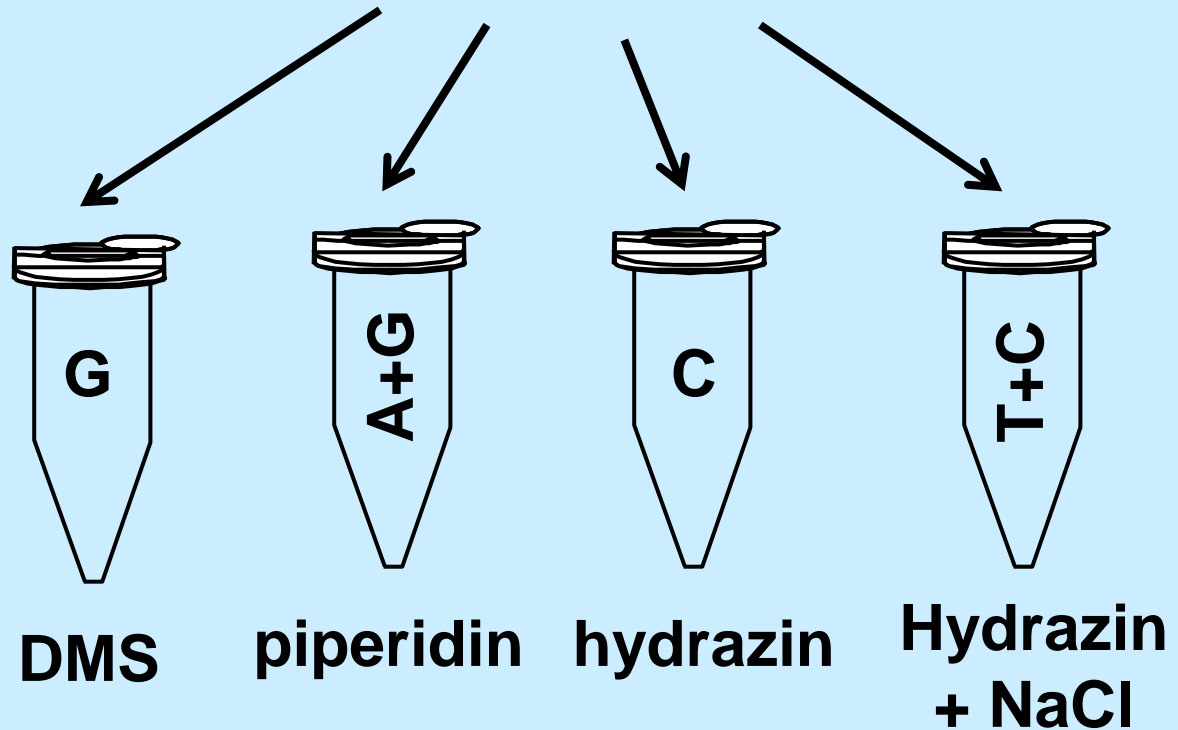
^{32}P - GATCAGG - 3'

Příprava
ssDNA a značení

Modifikace
bází

Štěpení
ssDNA

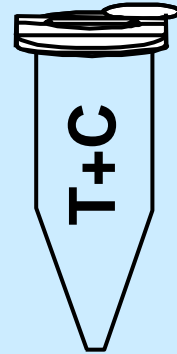
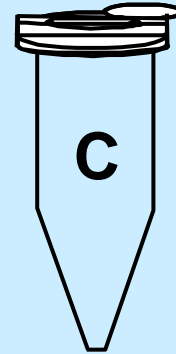
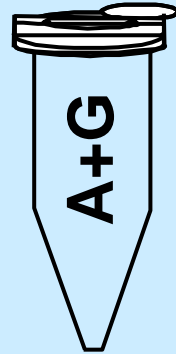
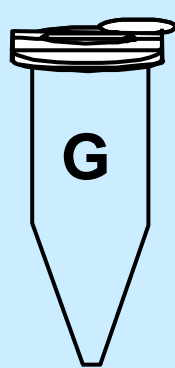
Odečtení
výsledku



Chemická metoda sekvenování

³²P - GATCAGG - 3'

Příprava
ssDNA a značení



DMS

piperidin

hydrazin

Hydrazin
+ NaCl

Modifikace
bází

Štěpení
ssDNA

Odečtení
výsledku

Štěpení piperidinem při vysoké teplotě

³²P -GATCAGG/G

³²P -G/ATCA/G/G

³²P -GATC/AGG

³²P -GAT/C/AGG

³²P - GATCAGG - 3'

G

DMS



³²P - GATCAG
³²P - GATCAGG

A+G

piperidin



³²P - GA
³²P - GATCA
³²P - GATCAG
³²P - GATCAGG

T+C

hydrazin



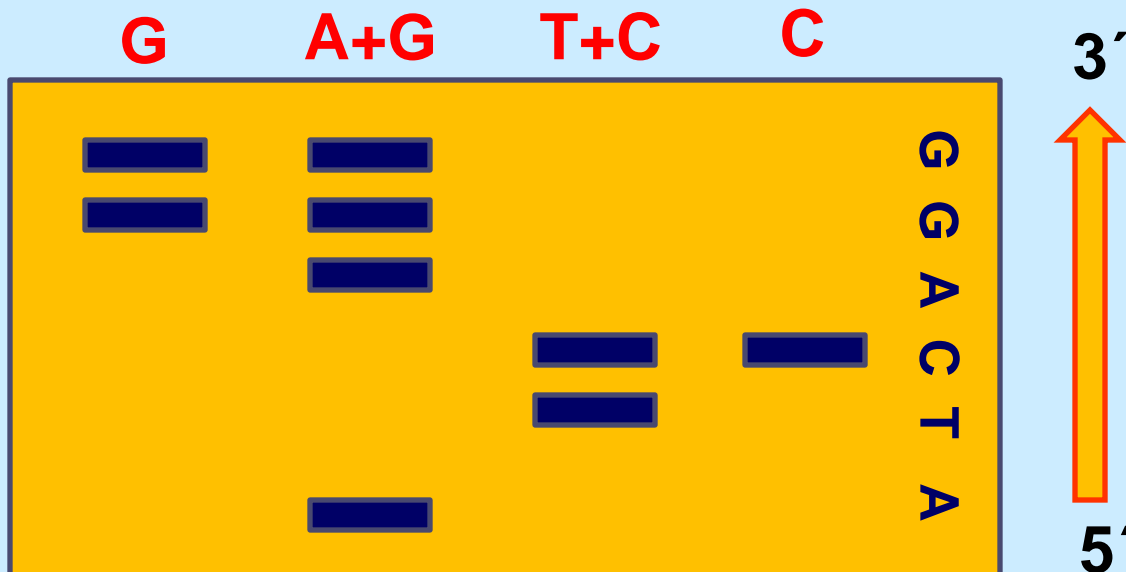
³²P - GAT
³²P - GATC

C

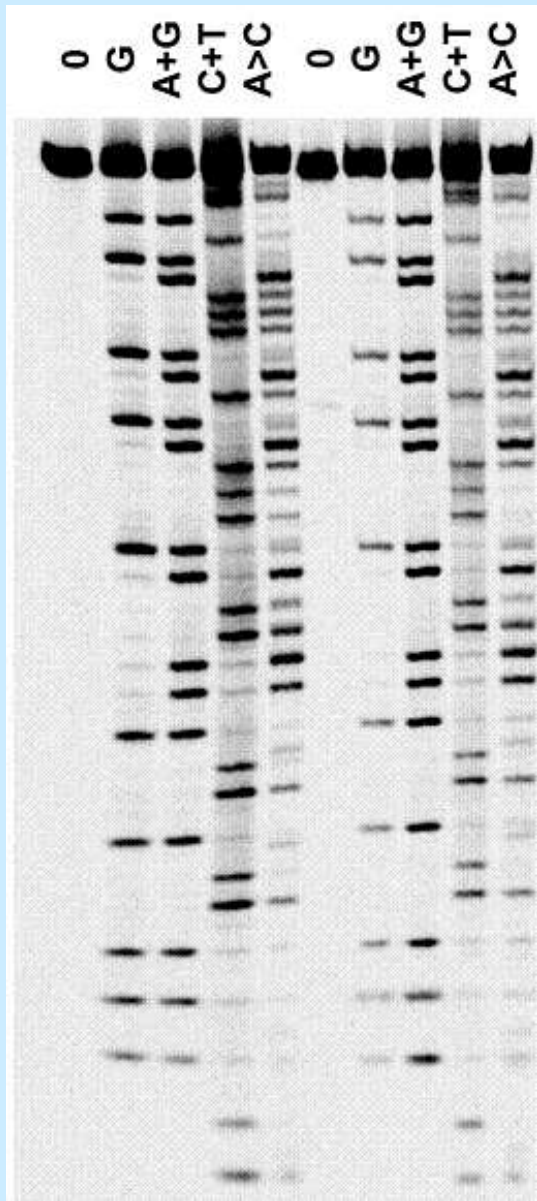
Hydrazin
+ NaCl



³²P - GATC



Reálný výsledek chemické metody sekvenování



Převzato z:

Site-specific DNA transesterification catalyzed by a restriction enzyme

Giedrius Sasnauskas*, Bernard A. Connolly†, Stephen E. Halford‡, and Virginijus Siksnys*§

*Institute of Biotechnology, Graiciuno 8, Vilnius, LT-02241, Lithuania; †Institute for Cell and Molecular Biosciences, University of Newcastle, Newcastle upon Tyne NE2 4HH, United Kingdom; and ‡Department of Biochemistry, School of Medical Sciences, University of Bristol, University Walk, Bristol BS8 1TD, United Kingdom

Úkol



Z výše uvedeného záznamu odečtěte výslednou nukleotidovou sekvenci

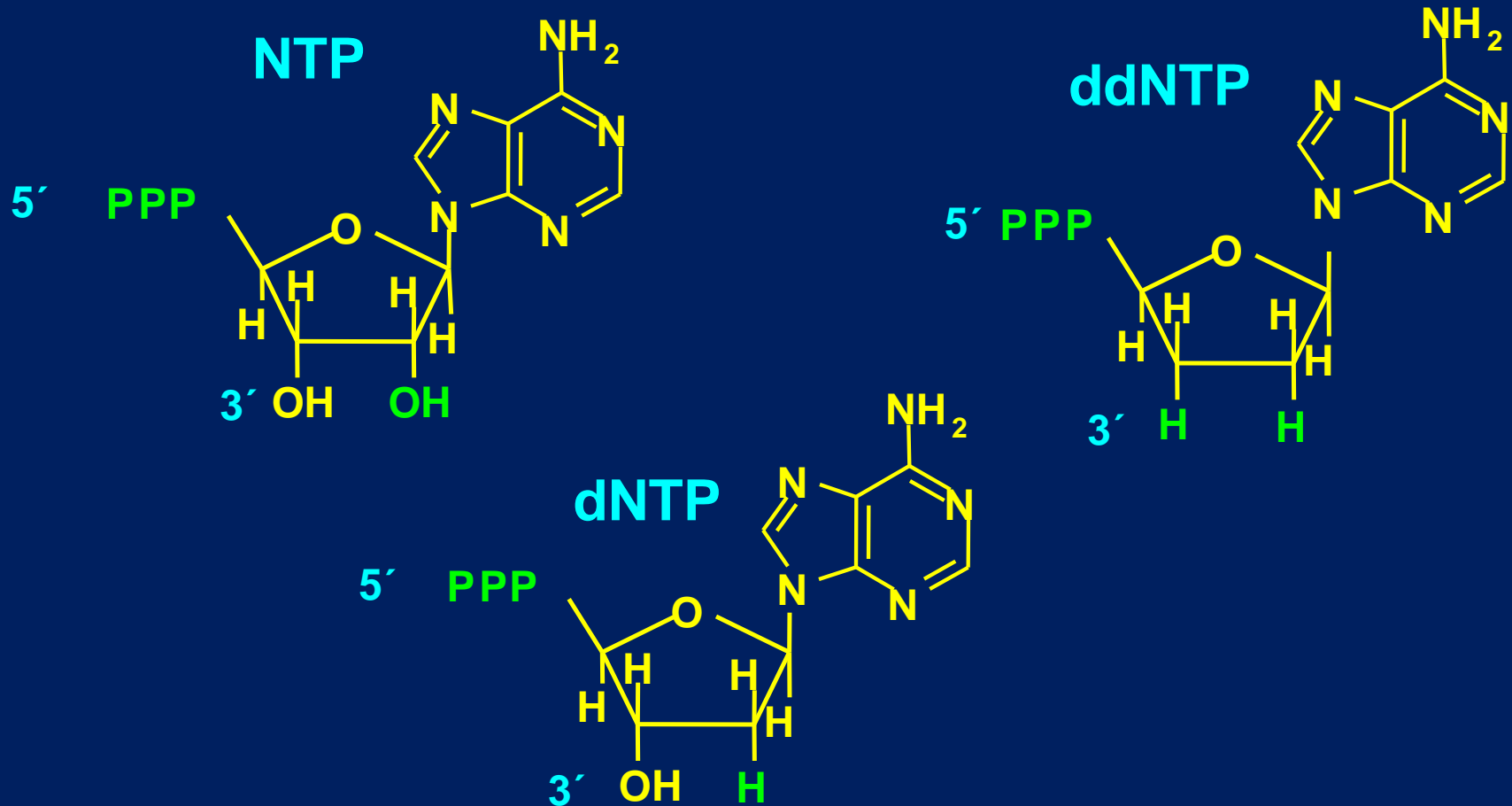
Výsledek bude tedy asi tento

CTg ggC TgC TgA ACC AgC CCA gCA
gCC Cag Tg

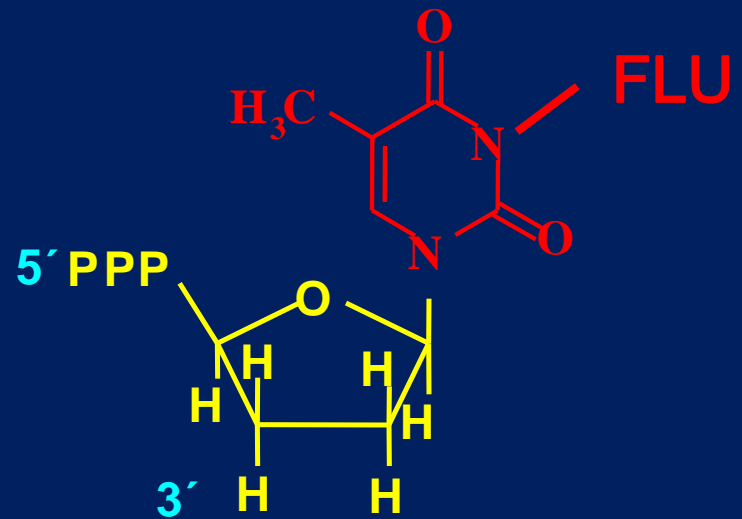
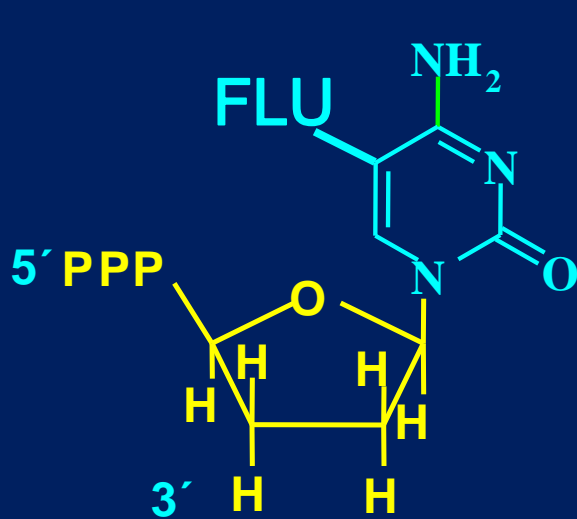
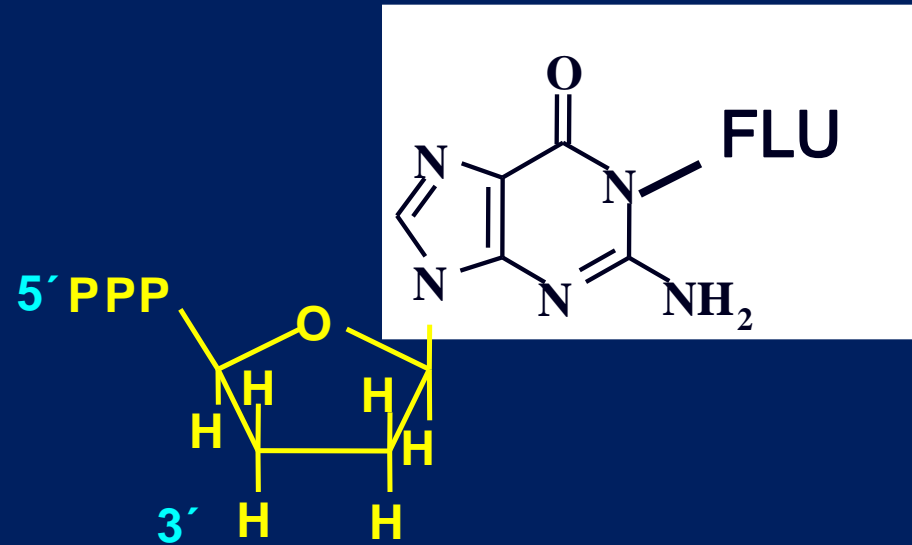
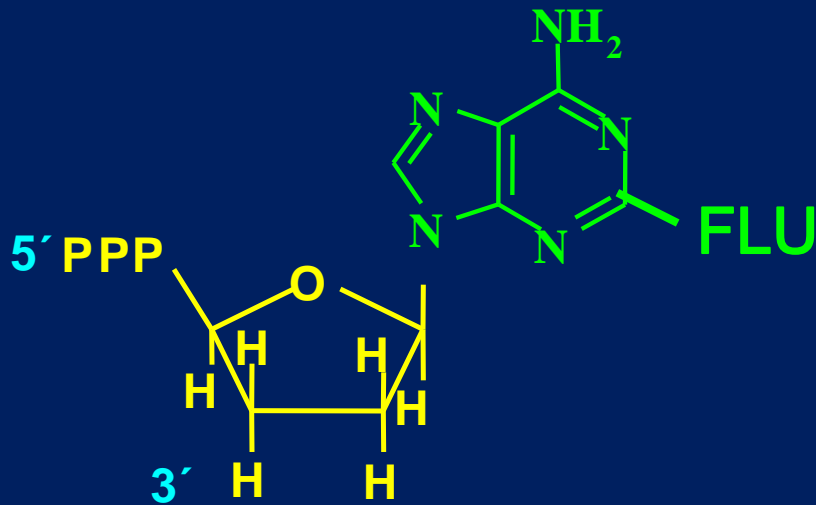


Sangerova metoda

dideoxyterminátory



Dideoxyterminátory



Průběh sekvenování

1. denaturace (92-96°C)



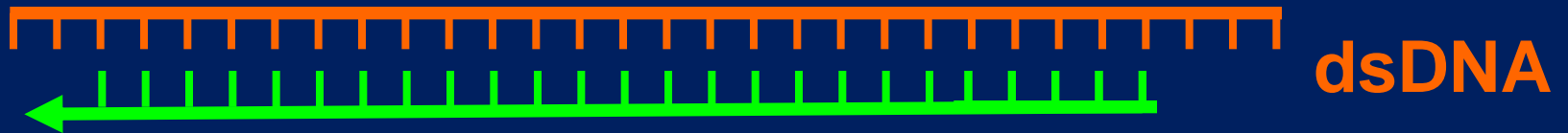
2. annealing (45-72°C)

3. extenze (72°C)



Průběh sekvenování

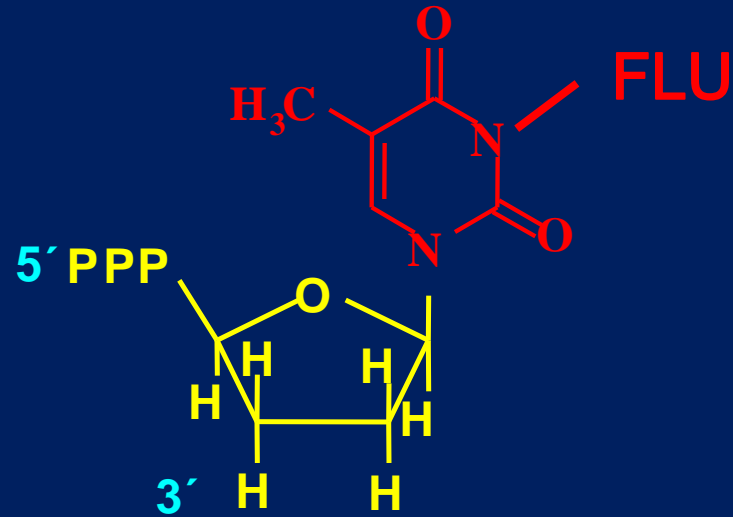
1. denaturace (92-96°C)



2. annealing (45-72°C)

3. extenze (72°C)

Zařazování ddTTP



TTTTTGTGCAAATCGGTGTAAACGGT

TTTTTGTGCAAATCGGTGT

TTTTTGTGCAAATCGGT

TTTTTGTGCAAA

ATGCTACGTTTAGCCACATTTGCCATATGAACCT



Zařazování dalších ddNTP

TTTTTGTCAAATCGGTGTA

TTTTTGTCAA

TTTTTGTCAA

TTTTTGTCA

ATGCTACGTTTAGCCACATTTGCCATATGAACCT



TTTTTGTCAAATCGGTGTAAC

TTTTTGTCAAATCC

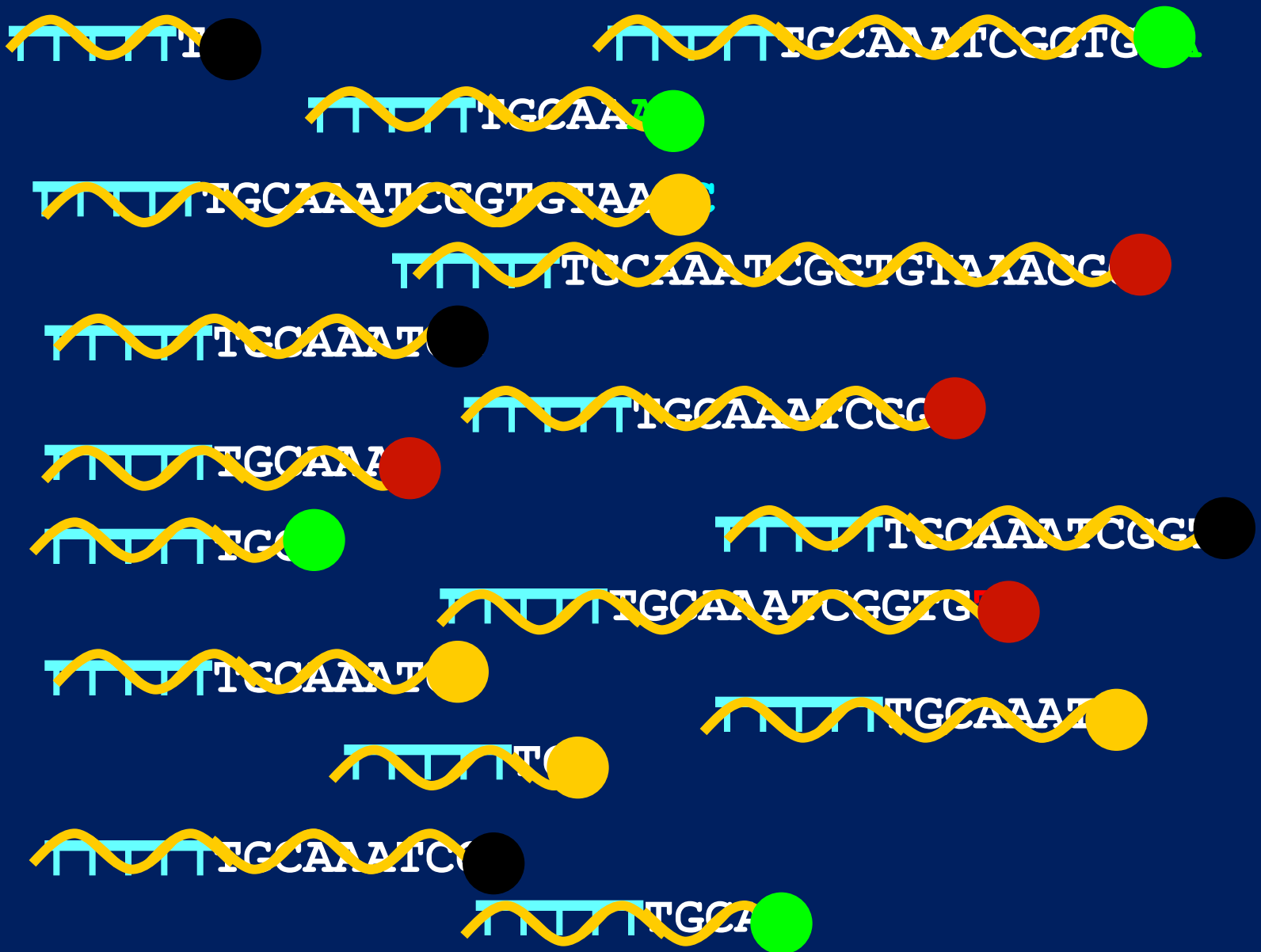
TTTTTGTCAAATC

TTTTTGTCA

ATGCTACGTTTAGCCACATTTGCCATATGAACCT



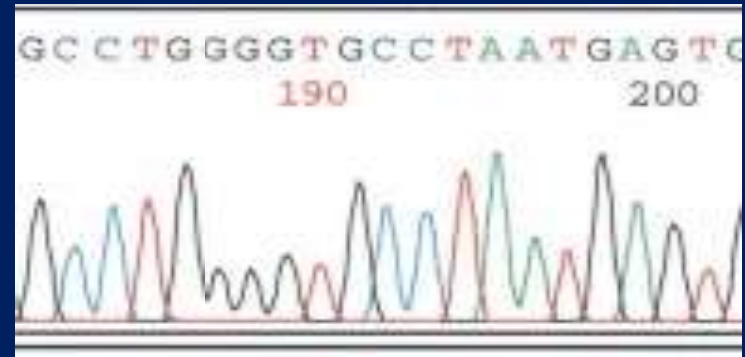
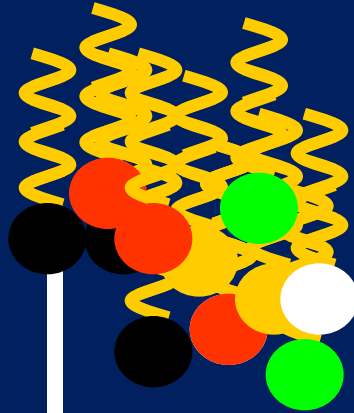
Výsledek sekvenování



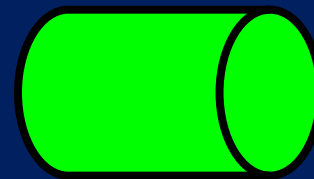
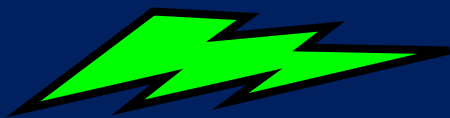
Následuje rozdělení fragmentů



Následuje rozdělení fragmentů

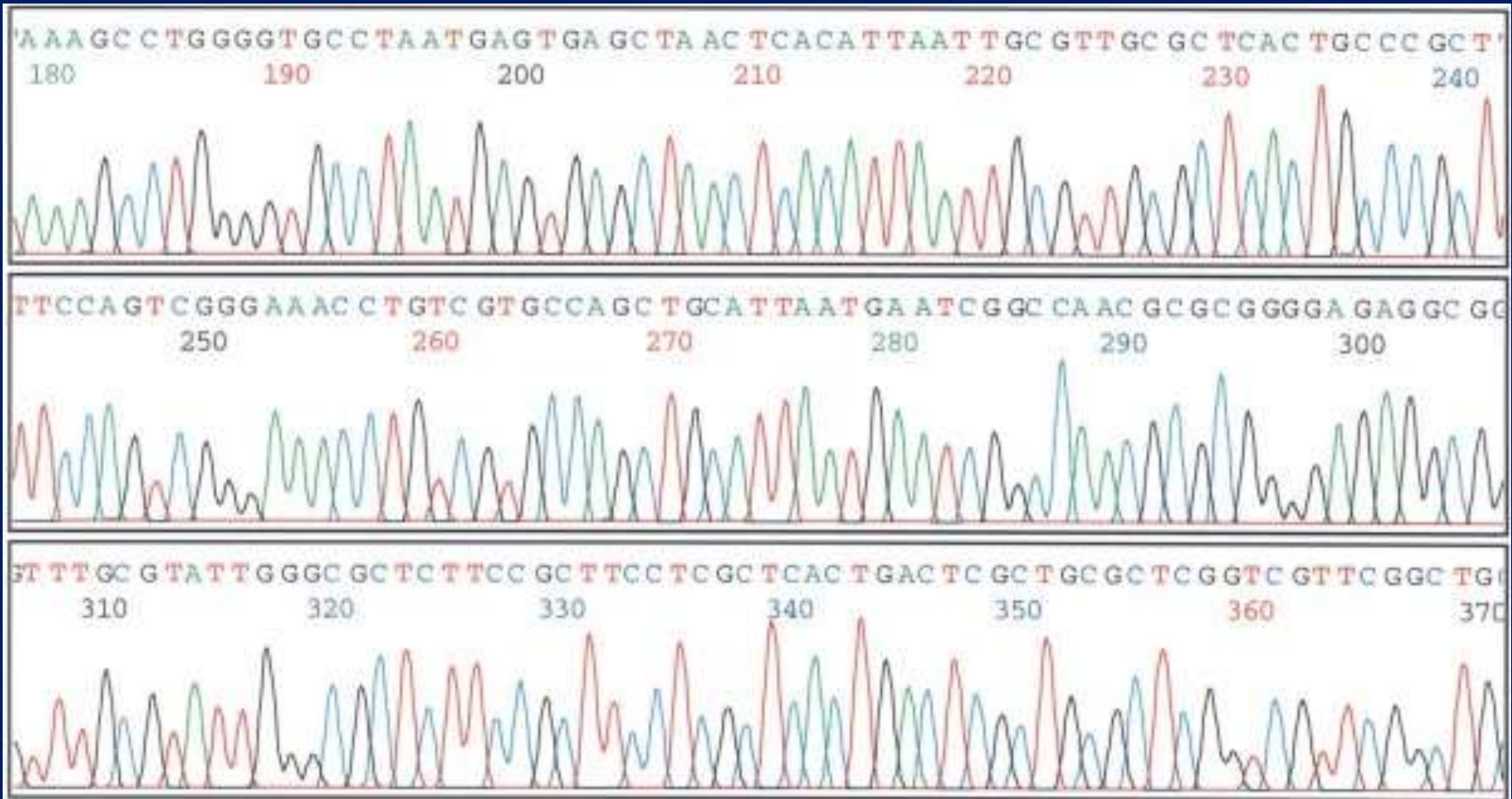


LASER



DETEKTOR

Sekvenování - záznam



Kapilární gelová elektroforéza



- **rozdělí produkty sekvenování podle velikosti**
- **detekuje fluorofory laserem**

Úkol

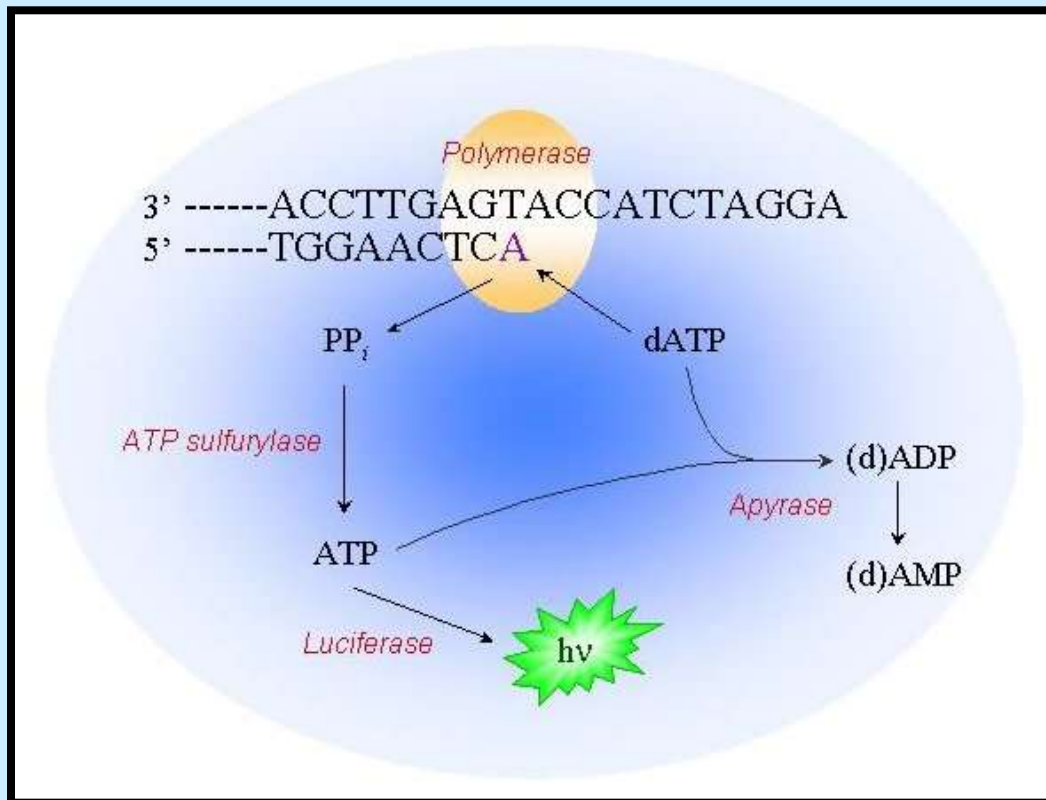


Na základě výsledků sekvenování
zařad'te izoláty bakterií čeledi
Pasteurellaceae

Použijte výukový materiál

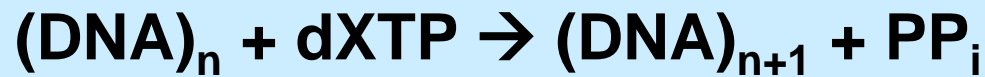
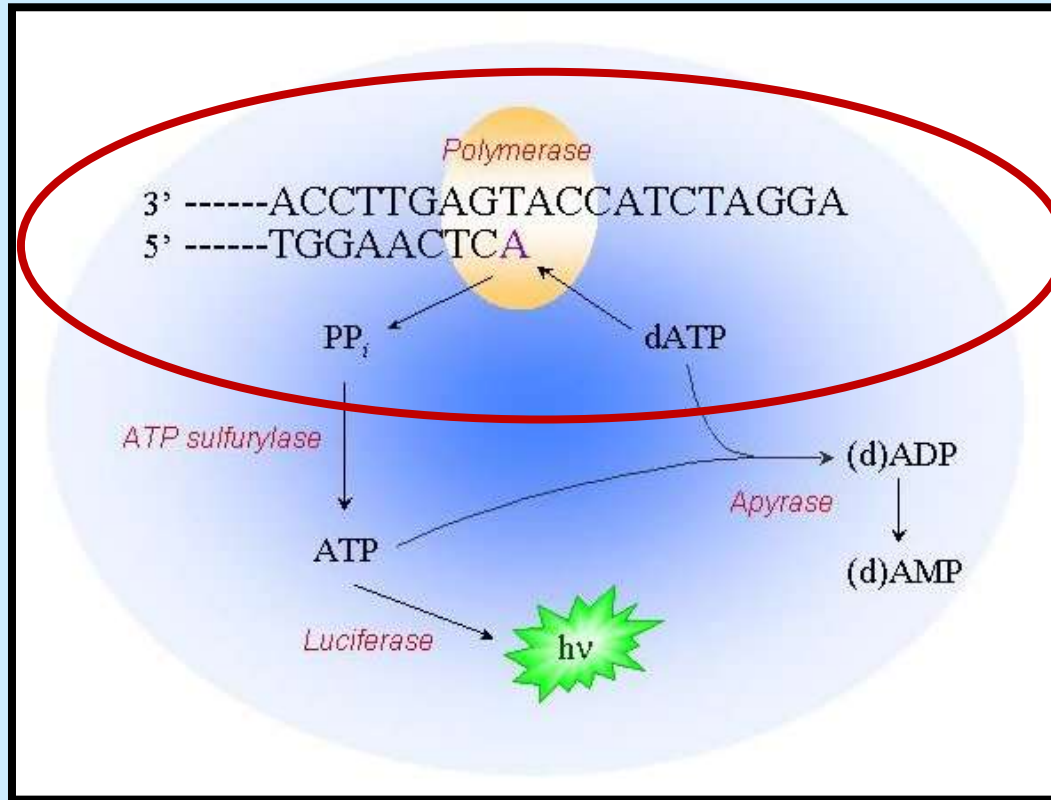
Pyrosekvenování

- Metoda popsaná Mostafa Ronaghi et al. v roce 1990
- Určena pro krátké úseky DNA, SNP a úseky metylované



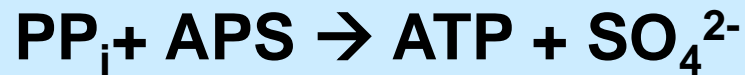
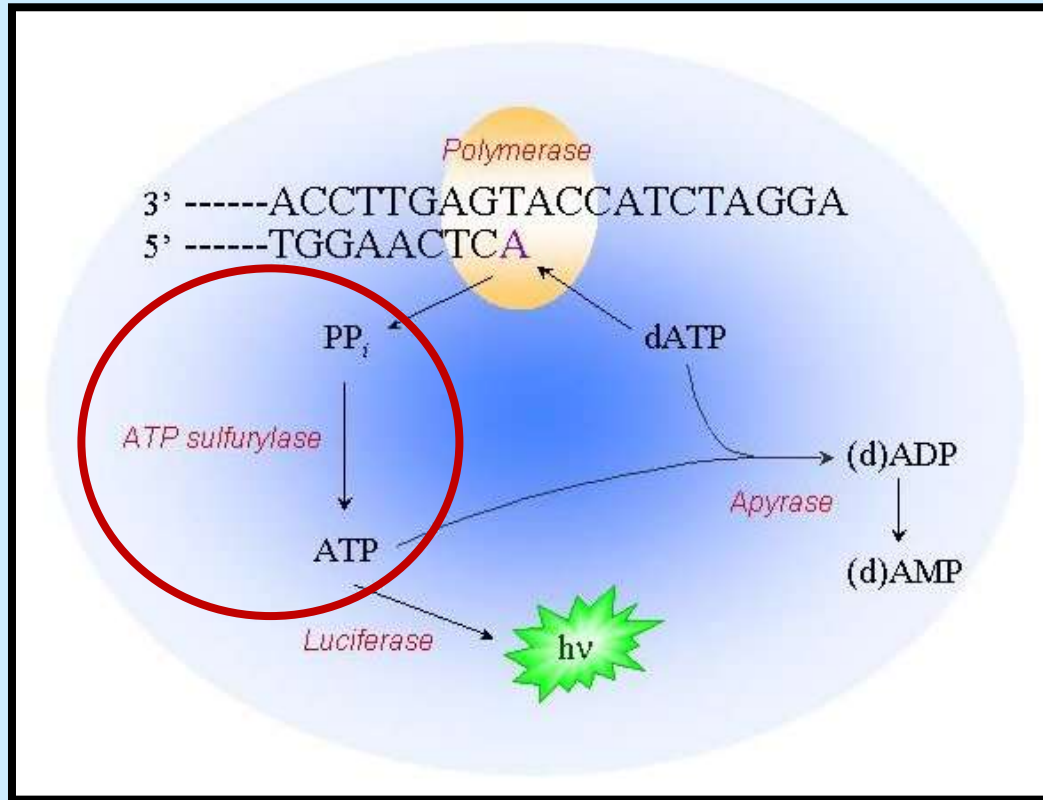
- 4 enzymy
- velmi přesná
- reakce se záhy „zahltí“

Průběh pyrosekvenování



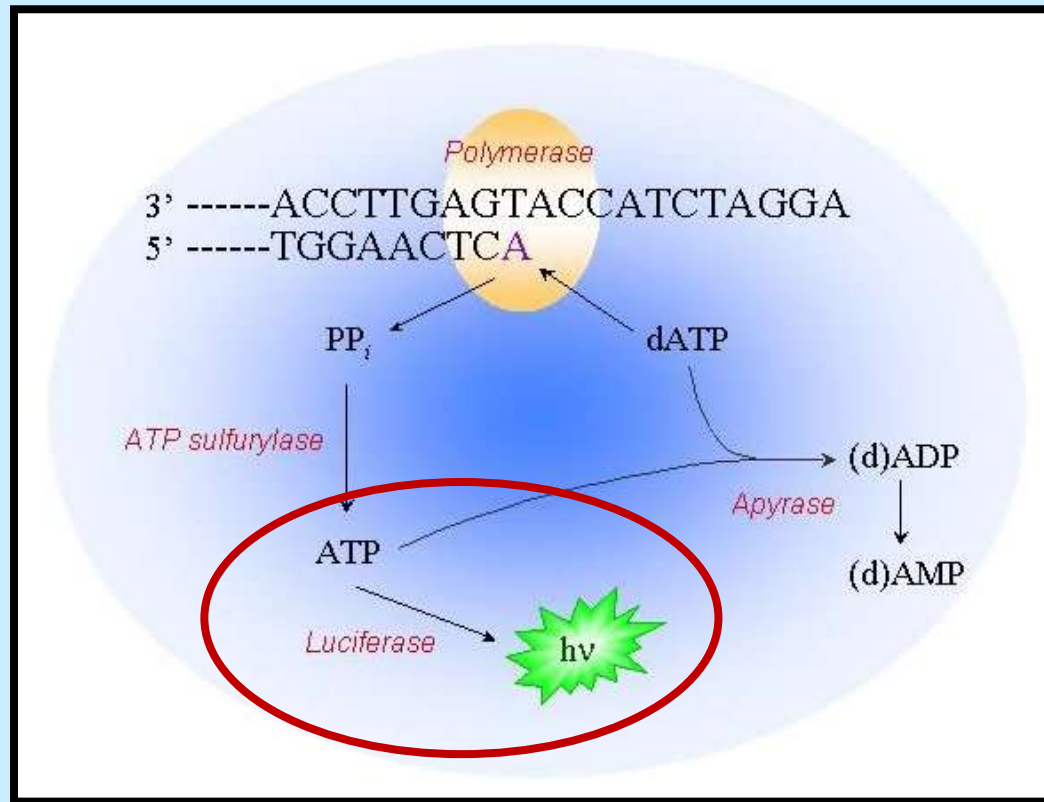
DNA polymeráza

Průběh pyrosekvenování



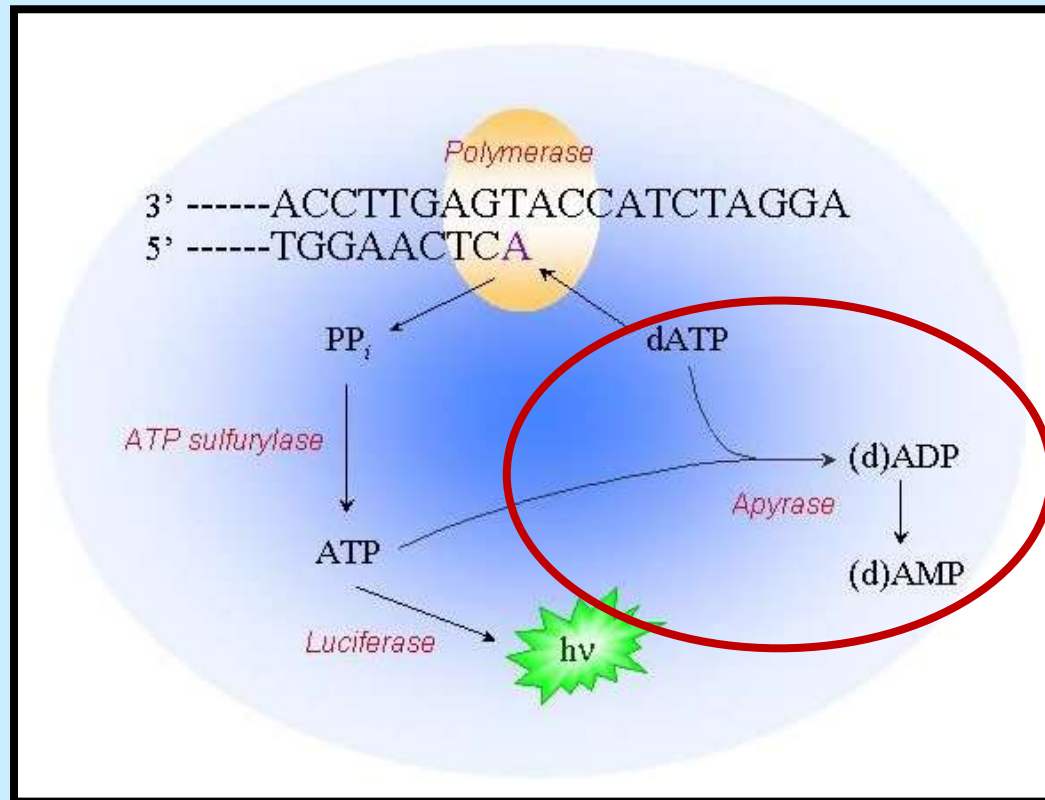
ATP sulfuryláza

Průběh pyrosekvenování



Luciferáza

Průběh pyrosekvenování



dXTP → dXMP

apyráza

Parametry pyrosekvenování

➤ žádné značené primery ani značené nukleotidy

➤ žádná elektroforéza

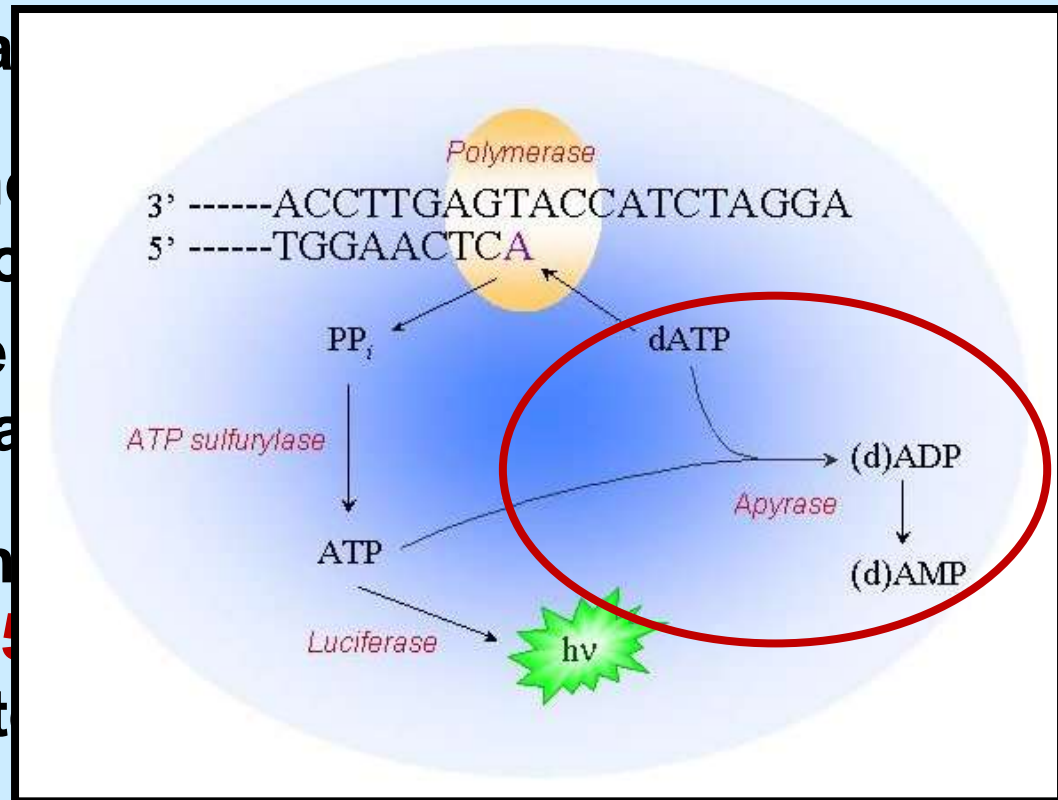
➤ Principem je uvolnění
a emise viditelného světla

➤ Množství uvolněného
množství zabudovaných

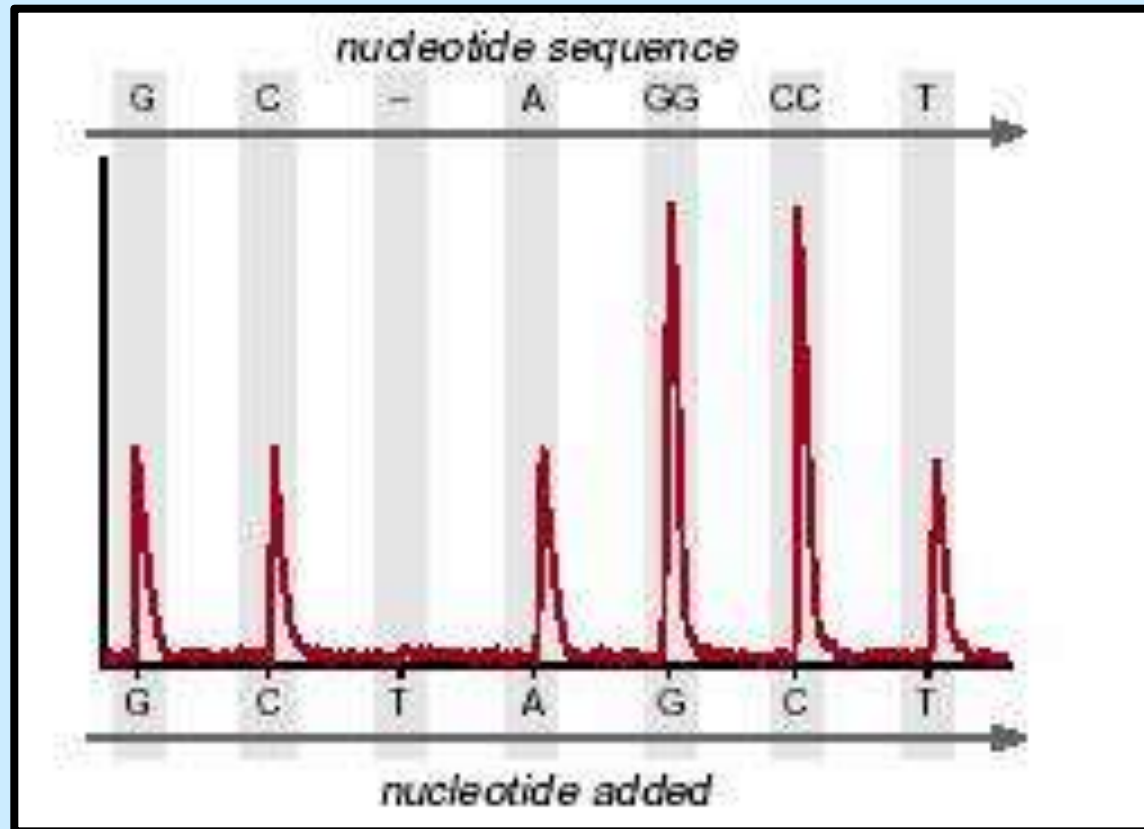
➤ Namísto standardního
2'-deoxyadenosin-5'
který není substrátem

➤ Rychlost sekvenování = 1 báze za minutu

➤ Délka stanovené sekvence = 100 nukleotidů



Pyrosekvenování - záznam



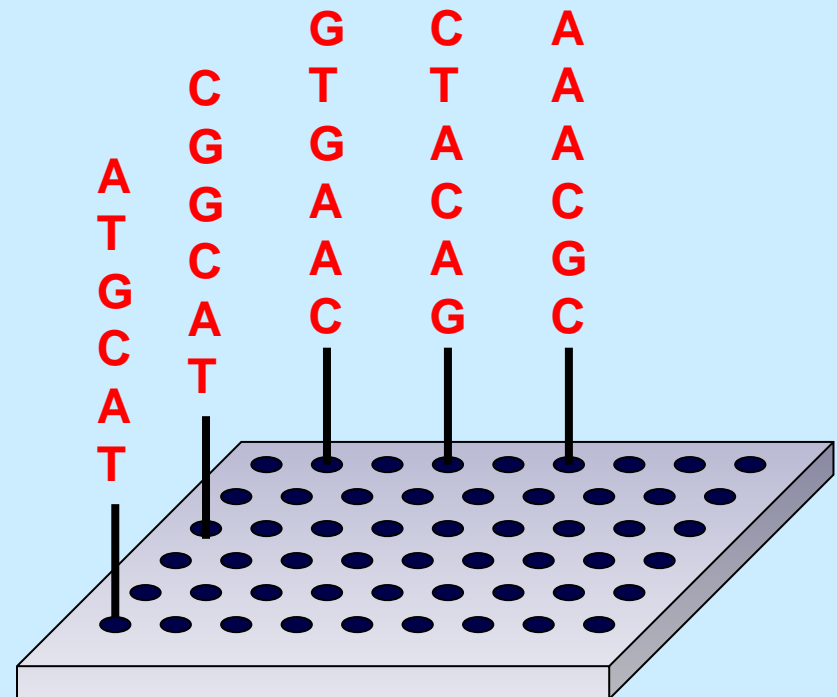
Intenzita signálu odpovídá počtu začleněných nukleotidů

Sekvenování pomocí hybridizace

- **Nepřímá metoda využívající DNA čipů**
- **Výsledek odečten konfokálním mikroskopem**
- **Sekvence odečtena dedukcí**



T
A
C
G
T
A



Otázka



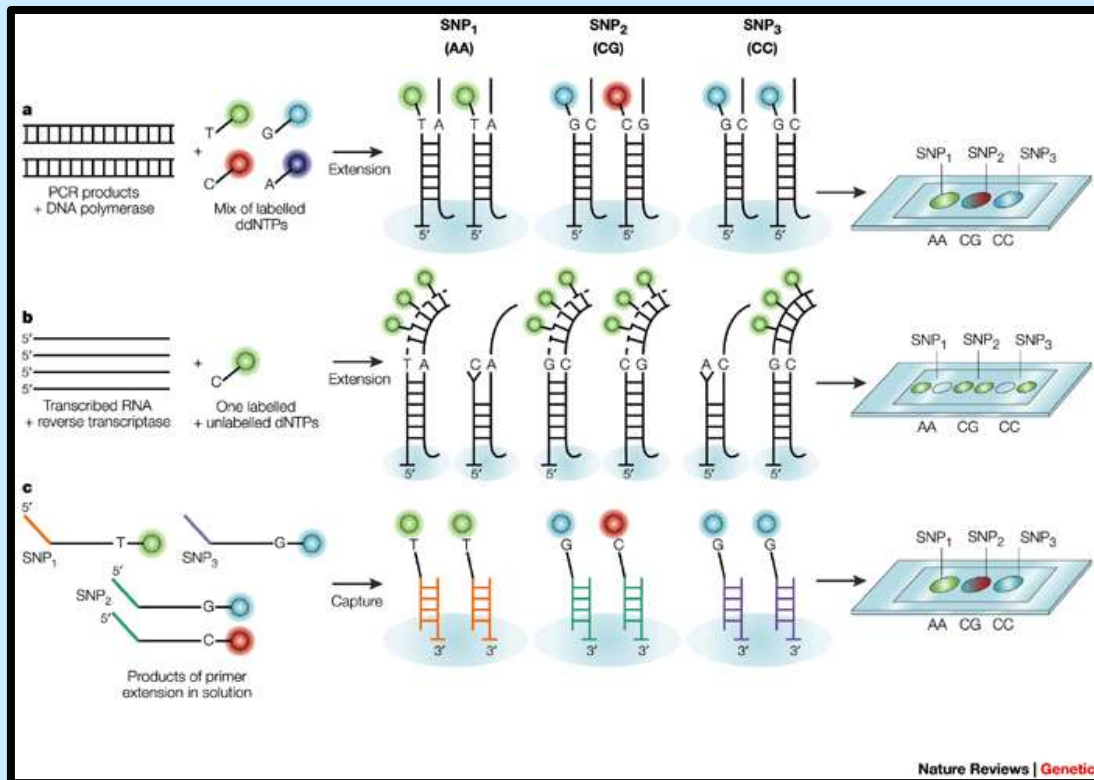
Kdyby byly na čipu naneseny 20 mery, kolik políček by musel obsahovat čip pro sekvenování 1 Mb?

Prý celkem $1,112 \times 10^6$

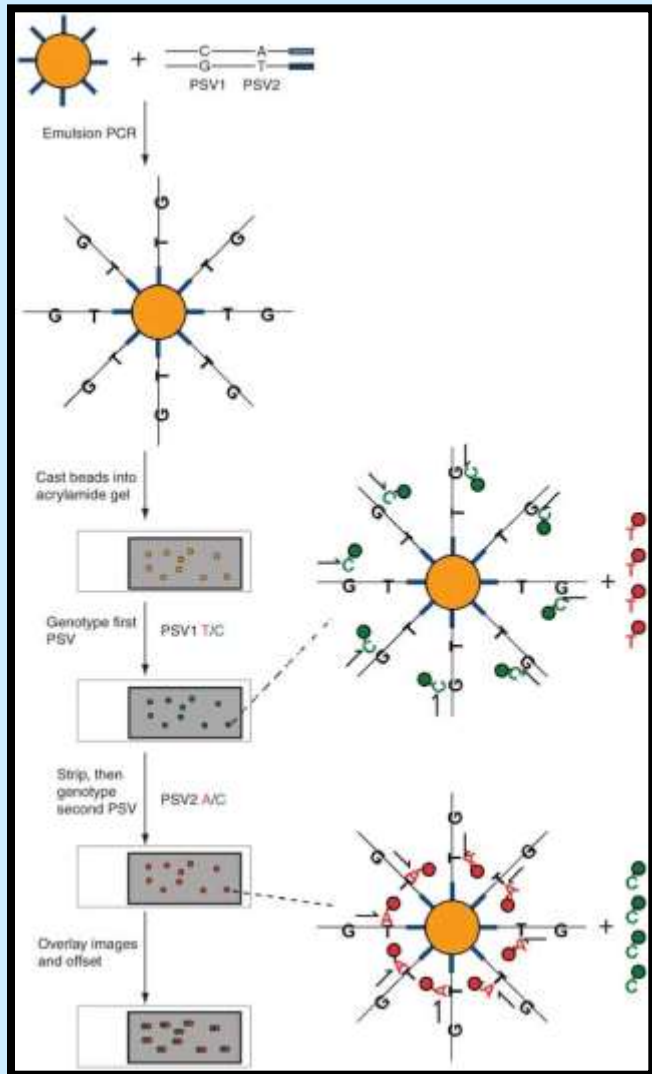


Minisekvenování

- Metoda využívající technologie DNA čipu
- Využívá se pro stanovení jednoduchých nukleotidových polymorfismů
- Více variant, metoda je automatizovaná, multiplexní



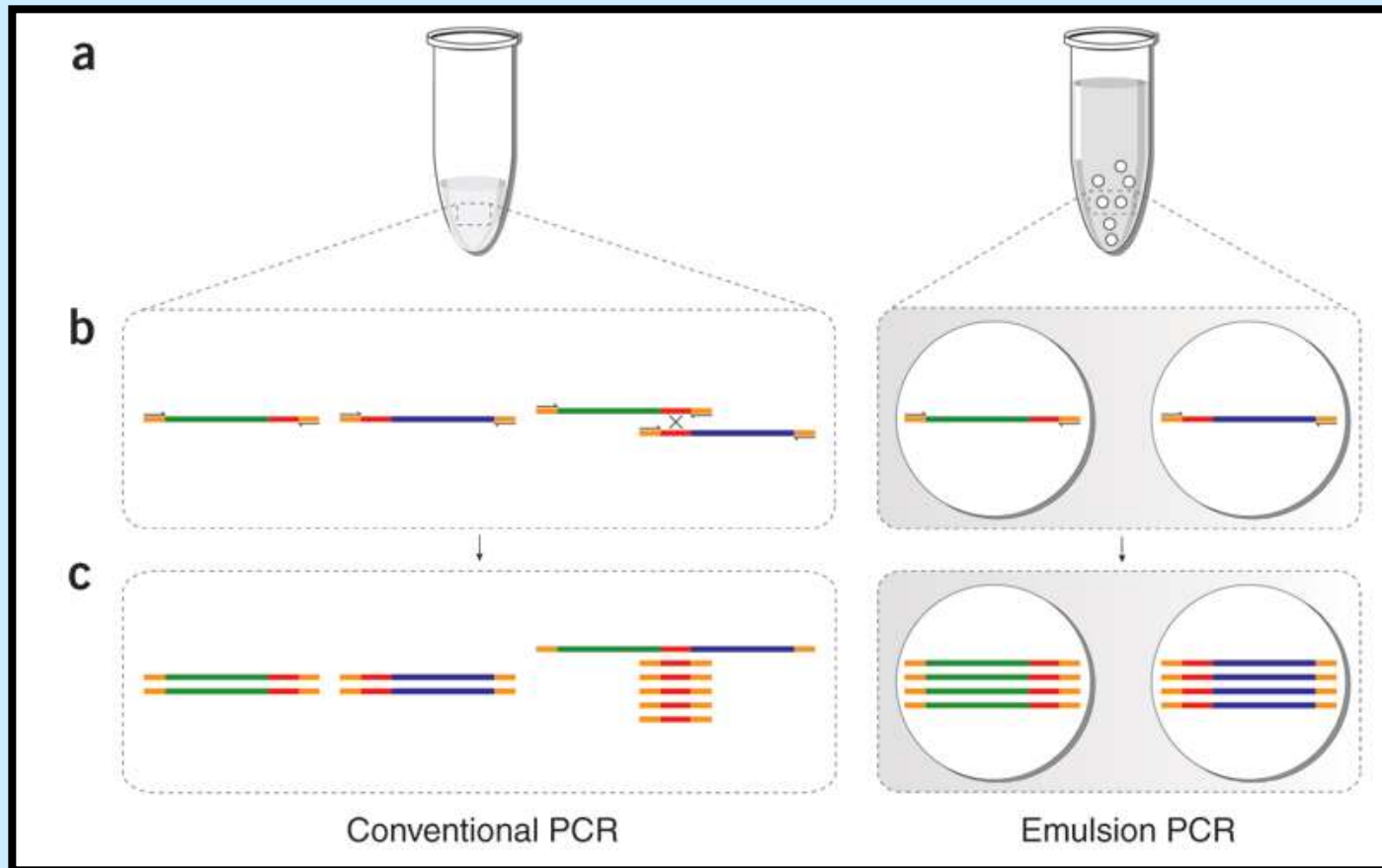
Emulsní PCR



- Amplifikace probíhá v emulsi (voda-olej)
- DNA je fragmentována na úseky dlouhé 300-800 bp
- Jednotlivé matrice jsou navázány samostatně na povrch jednotlivých kapek obalených primery

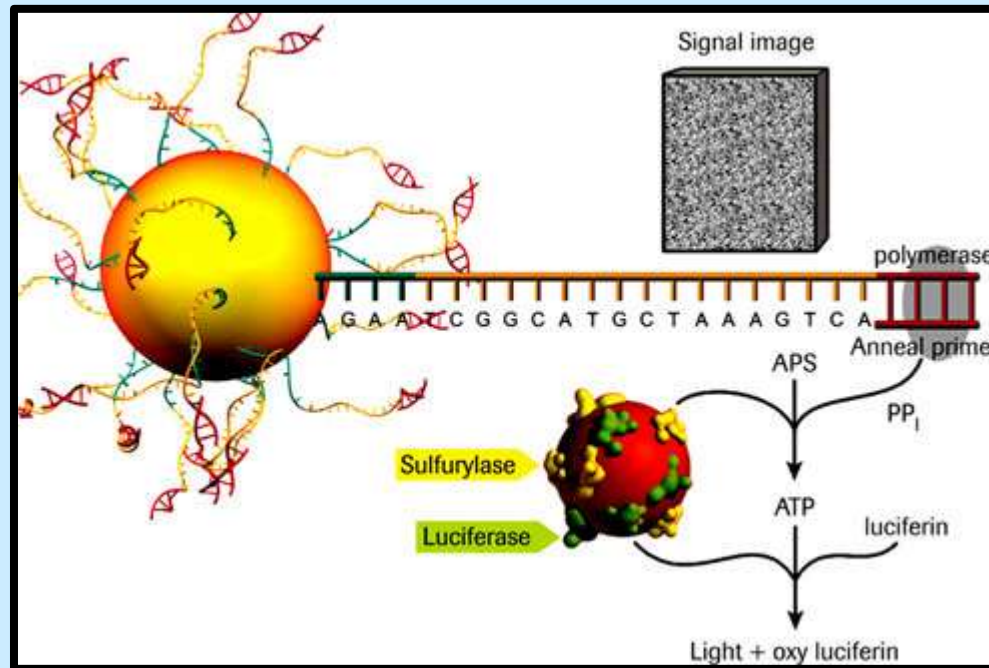
Emulsní PCR

- Amplikon je výsledkem jedinečné PCR
- Méně nespecifických produktů



Komerční aplikace emulsní PCR

454 sekvenční systém firmy Roche



- Produkty PCR jsou sekvenovány pyrosekvenováním

454 sekvenční systém

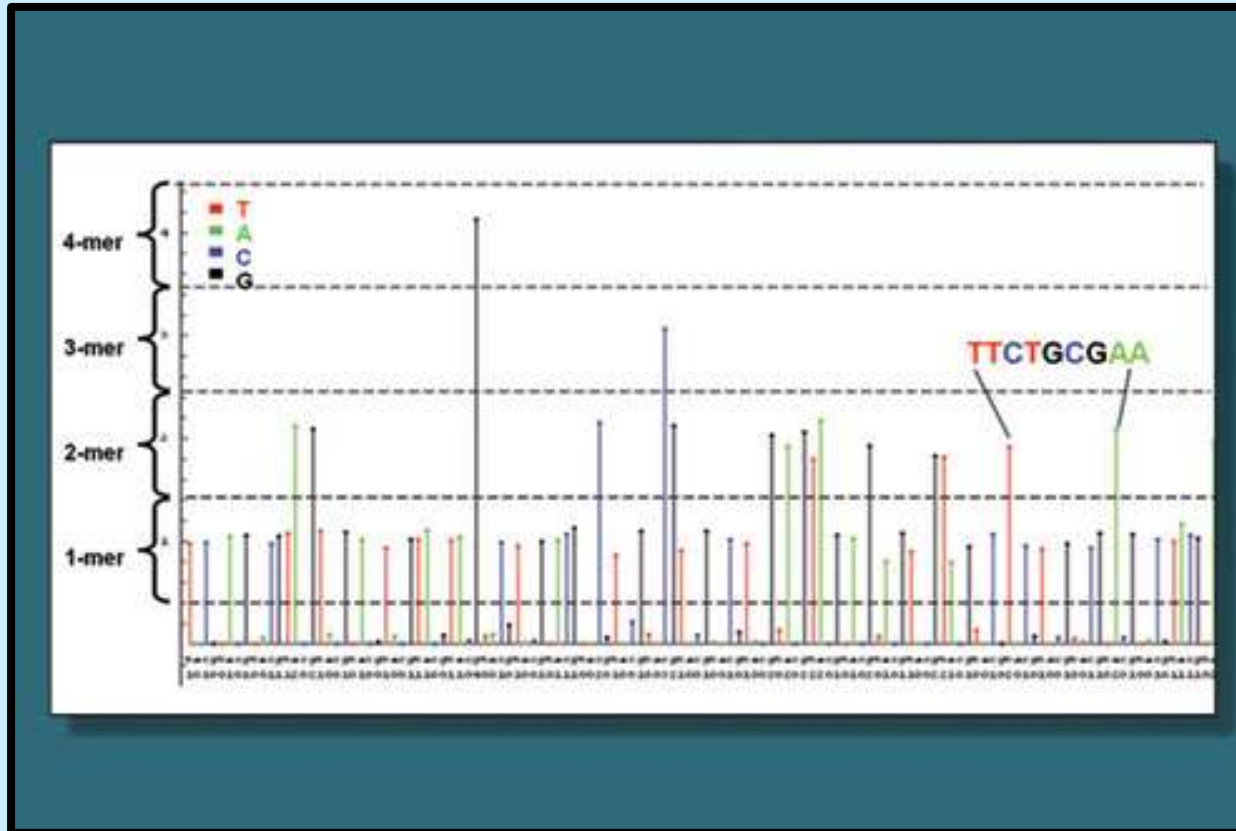
Základní kroky

- **Tvorba jednořetězcových DNA matic**
- **Připojení adaptérů a vazba na pevné částice**
- **Amplifikace DNA matic v emulzi**
- **Vytvoření sekvenčních dat**
- **Analýza sekvencí různými nástroji bioinformatiky**

**Podívejte se na komerční prezentaci na stránkách
<http://454.com/products/technology.asp>**

454 sekvenční systém

Výsledný záznam



**Další moderní přístupy
najdete na**

<http://grf.lshtm.ac.uk/sequencing.htm>

**SOLiD
(Applied Biosystems)**

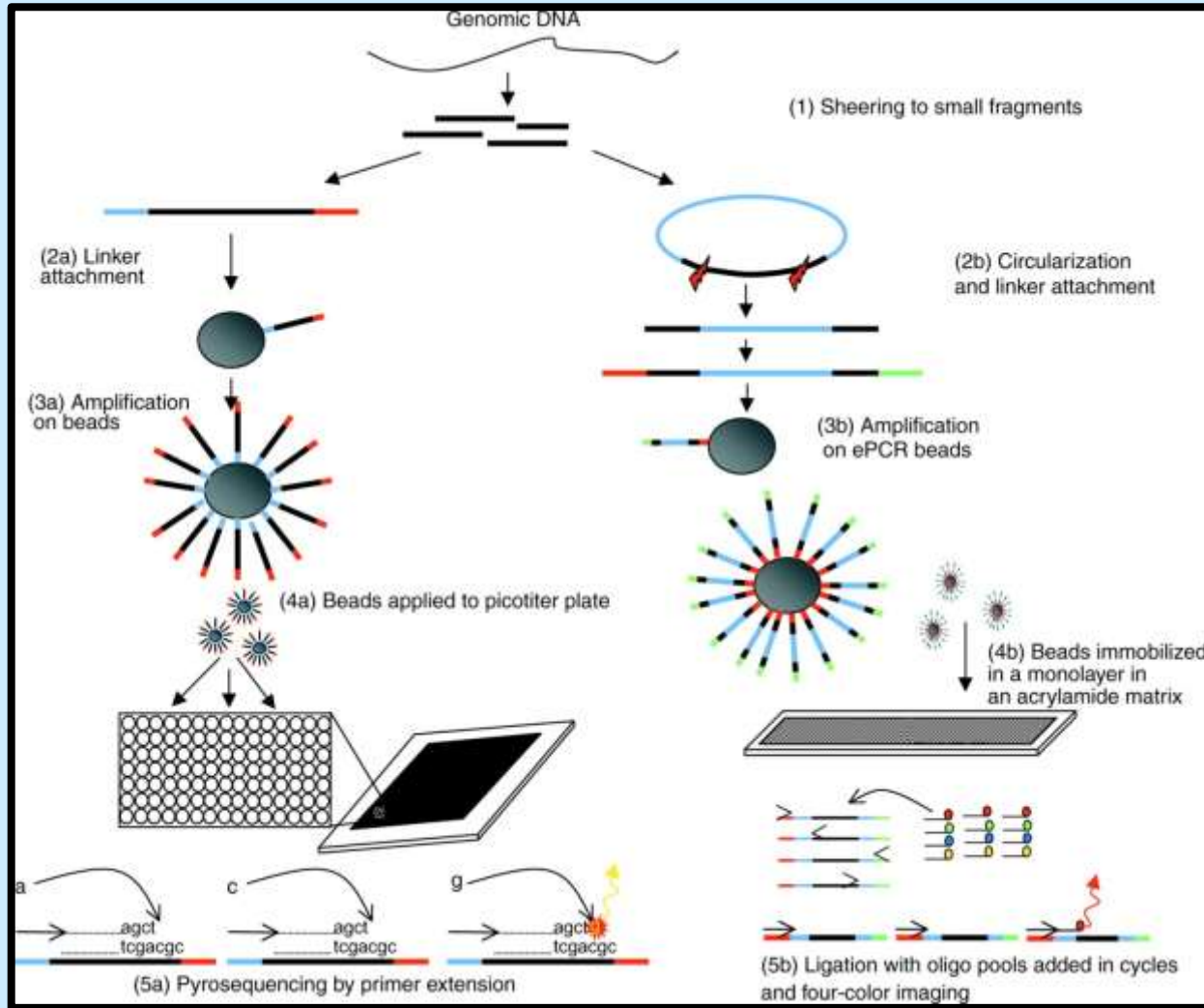
**454/Pyrosequencing
(Roche)**

**SOLEXA
(Illumina)**



Porovnání 454 a polony (SOLiD)

přímé
připojení
adapterů



cirkularizace
a linearizace

destička

pyrosekve
nování

monovrstva
na PAGE

ligace
značených
oligo

Sekvenování mikroorganismů

- První sekvenovaný mikroorganismus = *Haemophilus influenzae*, 1995, TIGR
- V roce 2000 následovaly *Mycobacterium tuberculosis*, *Escherichia coli* a *Archaeoglobus fulgidus*
- První eukaryotický mikroorganismus = *Plasmodium falciparum*, 2002
- Následovaly kvasinky, ...
- V současnosti jsou v databázích stovky sekvencí
- Podívejte se na <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>

Úkol



Podívejte se do databáze a zjistěte, u kolika halobakterií (třída *Halobacteria*) je v současné době známa nukleotidová sekvence genomu, a to jak kompletní, tak i částečná

Zjistěte totéž u čeledi *Pasteurellaceae*

A ještě u cyanobakterií (kmen *Cyanobacteria*)

Další příklady I

Genome Gallery

A selection of notable genomes that have been sequenced.

Φ X 174

(1977) 5386 bp

First genome sequenced, a bacteriophage

Haemophilus influenzae

(1995) 1 830 000 bp

First genome of a free-living organism

Mycoplasma genitalium

(1995) 580 000 bp

Smallest genome of any free-living organism

Saccharomyces cerevisiae

(1996) 12 100 000 bp

First genome of a 'eukaryotic' (nucleus-containing) organism, the yeast used by brewers and bakers

Methanococcus jannaschii

(1996) 1 660 000 bp

The first genome from the third kingdom, *Archae*, which comprises microbes that live in harsh environments, for example thermal springs

Escherichia coli

(1997) 4 670 000 bp

Workhorse bacterium for biologists

Helicobacter pylori

(1997) 1 660 000 bp

Bacterium associated with gastric disease



Dr Linda Stannard, UCT / Science Photo Library

Další příklady II

Genome Gallery



Wellcome Photo Library

Mycobacterium tuberculosis
(1998) 4 400 000 bp
Cause of the disease
tuberculosis

Deinococcus radiodurans
(1999) 2 600 000 bp Highly
radiation-resistant bacterium

First human chromosomes
(1999 and 2000)

Chromosomes 22,
48 000 000 bp and 21,
45 000 000 bp respectively



National Human Genome
Research Institute, NIH

Caenorhabditis elegans
(1998) 97 000 000 bp
The first genome sequence
of an animal, the roundworm

AVP, LSHTM/Wellcome Photo Library



Drosophila melanogaster
(2000) 180 000 000 bp
Fruit fly, an important labor-
atory organism in genetics

Další příklady III

Genome Gallery



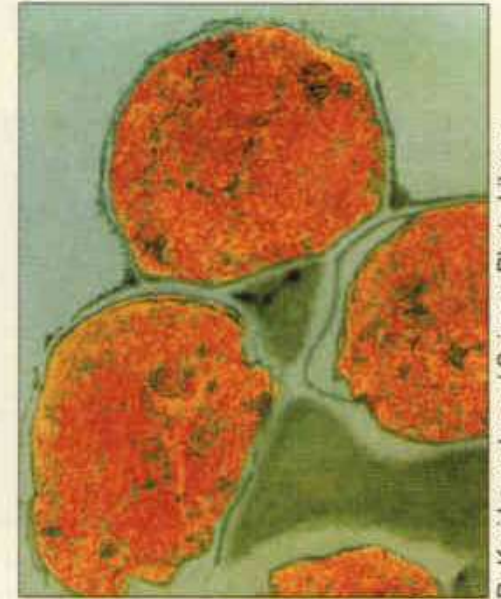
Eye of Science / Science Photo Library

Vibrio cholerae
(2000) 4 030 000 bp
Cause of the disease
cholera



Images courtesy of J. Berger, T. Laux & E. Meyerowitz

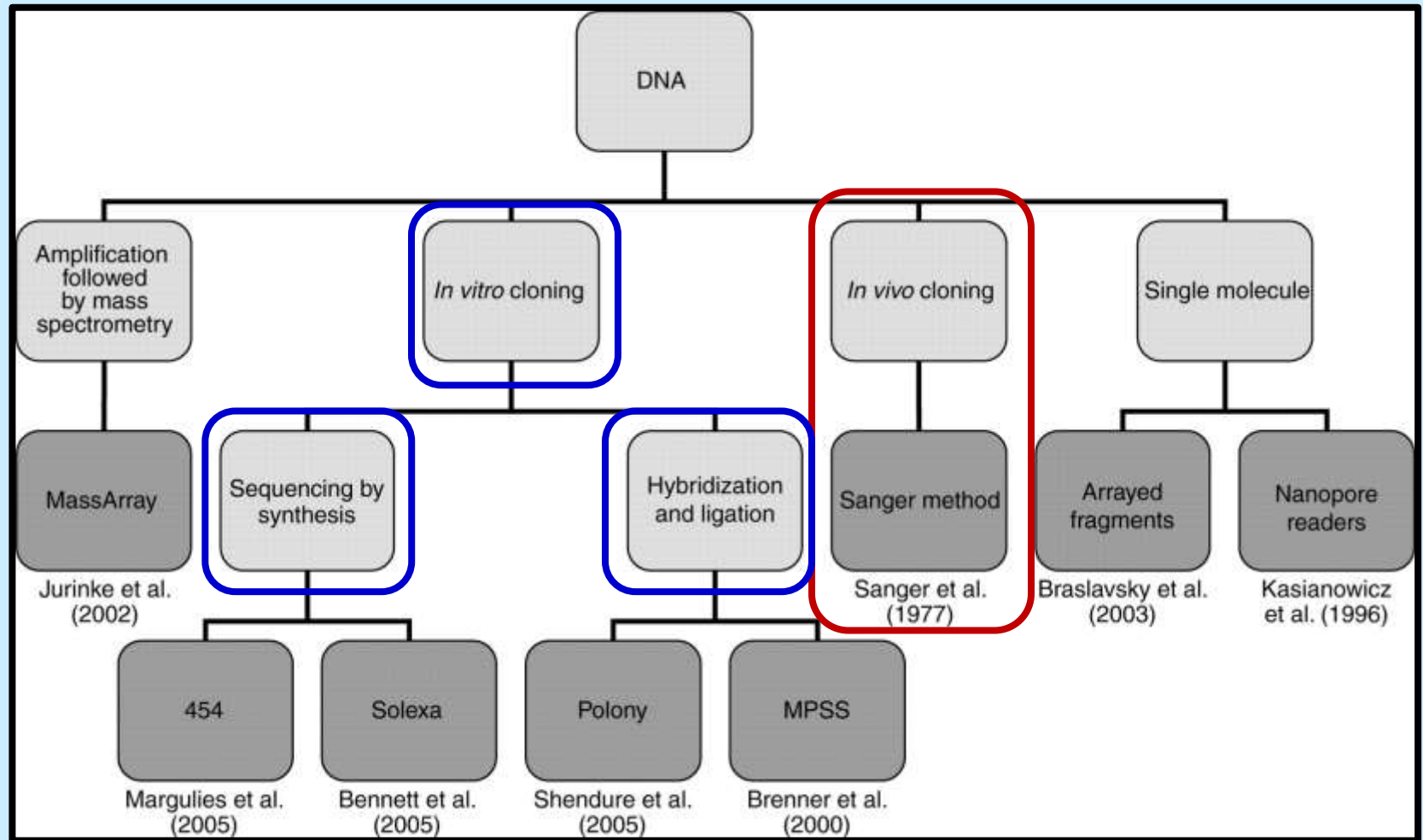
Arabidopsis thaliana
(2000) 120 000 000 bp
The first genome of a plant,
the mustard weed



Dr Kari Lounatmaa / Science Photo Library

Mycobacterium leprae
(2001) 3 270 000 bp
Cause of the disease
leprosy

Přehled stávajících a nových technik celogenomového sekvenování



A teď se podíváme na něco praktického



Použijte připravený výukový materiál ze sekvenování zástupců čeledi *Pasteurellaceae*

Shrnutí

- 1) Pojem sekvenování**
- 2) Maxamovo-Gilbertovo sekvenování**
- 3) Sangerova metoda s využitím fluoroforů**
- 4) Pyrosekvenování**
- 5) Nové přístupy k sekvenování**
- 6) Příklad reálné analýzy**