

MODULARIZACE VÝUKY EVOLUČNÍ A EKOLOGICKÉ BIOLOGIE

CZ.1.07/2.2.00/15.0204



Metodologie molekulární fylogeneze a taxonomie hmyzu

Bi7770

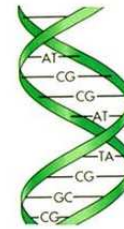
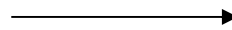
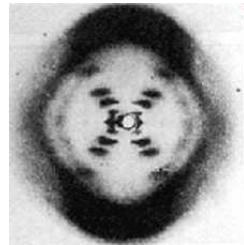
Andrea Tóthová



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Metodické přístupy stanovení primární struktury DNA

- Historie:



- **1953**: struktura DNA (James Watson a Francis Crick; *Nature*, NC 1962)
- **1964**: NC 1968 rozluštění genetického kódu (Nirenberg M. a Matthaei H.)
- **1977**: sekvenování chemickou degradací – neenzymatické štěpení DNA (Allan **Maxam** a Walter **Gilbert**, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*)
- **1977**: sekvenování terminátorovou metodou (Frederick **Sanger**, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*)
- **1986**: objev PCR (**Mullis**; NC, dr.h.c. LF MU)
 - Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., and Erlich H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology*. 51 Pt 1:263–373

- Aktuální stav:
 - **1996: sekvenování druhé generace** – pyrosekvenování (Nyrén P., Ronaghi M. ; Stockholm), 454 sekvenování Roche/454, Illumina Genome Analyzer Iix, Life Technologies SOLiD 4 a další
 - **21. století: sekvenování třetí generace** – SMRT (single molecule real-time) – 2008; 2013 (Pacific Biosciences), nanotechnologie, hmotnostní spektrometrie, konfokální laserové spektrometrie a další
- Výběr technologie závisí od plánovaného využití analýz

MAXAM - GILBERTOVA METODA

- A. M. Maxam a W. Gilbert-1977
- Sekvence DNA je vystavena určitým chemikáliím, které nasekají vlákno ve specifických místech (nukleotidech)



Maxam-Gilbert

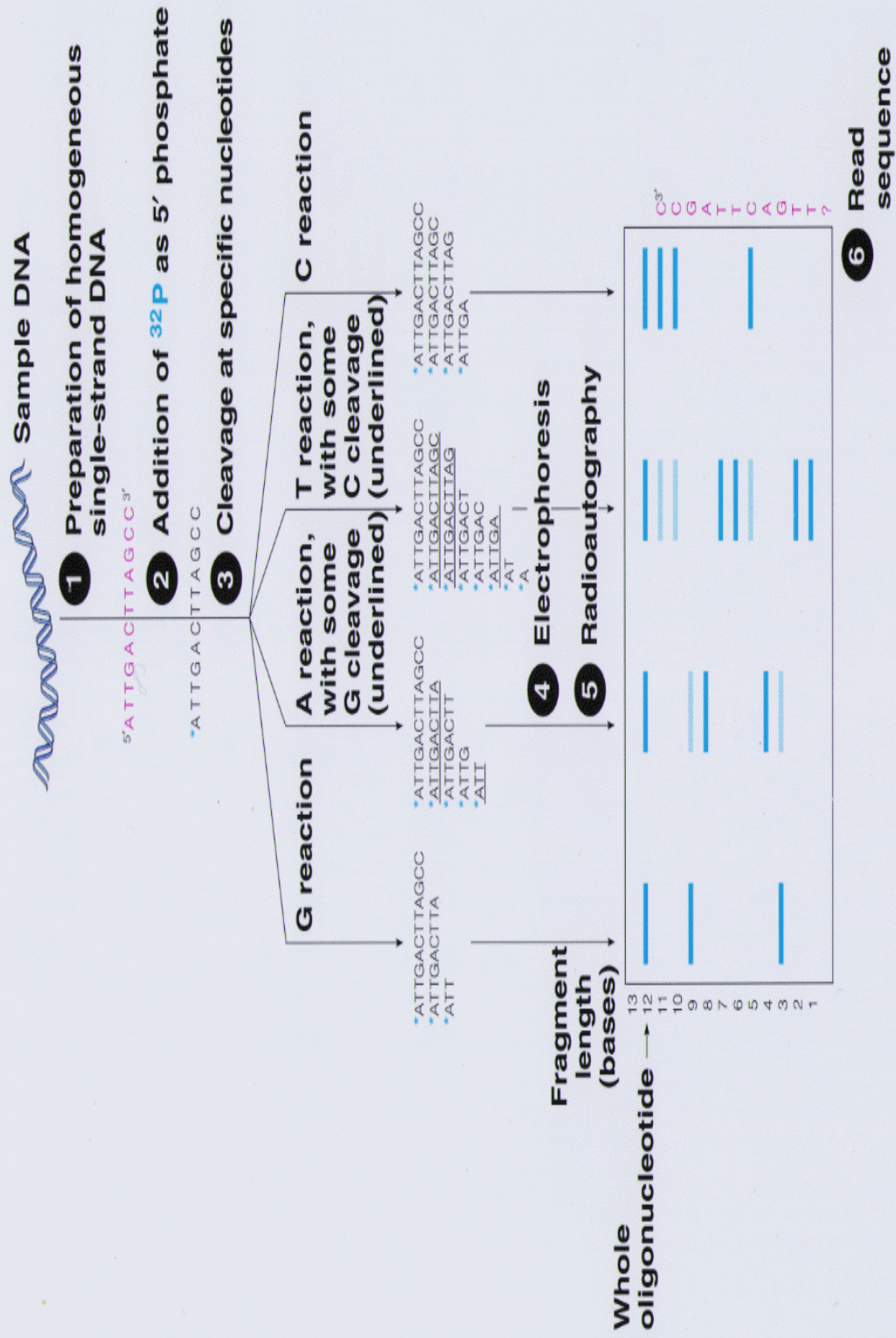
- ds DNA
- Radioaktivní značení 5'konce ds molekuly [γ - ^{32}P] ATP (alkalická fosfatáza, polynukleotid kináza)
- Denaturace a separace vláken
- Chemická modifikace vlákna - metylace (G-dimetylsulfát, AT-kyselina mravenčí, CT-hydrazín, C-NaCl s hydrazínem)
- Selekční štěpení metylací piperidinem
- Elektroforéza
- Autoradiografie
- Vysoko radioaktivní látka, poločas rozpadu 14 dní, několik desítek bazí na gelu

- Dnes se již nepoužívá

Table 10.1 Specific Base Reactions in Maxam-Gilbert Sequencing

Chain breaks at:	Base Modifier	Reaction	Time (min at 25°C)
G	Dimethylsulphate	Methylates G	4
G + A	Formic acid	Protonates purines	5
T + C	Hydrazine	Splits pyrimidine rings	8
C	Hydrazine + salt	Splits only C rings	8

Figure 4A.4 Sequencing an oligonucleotide by the Maxam-Gilbert method



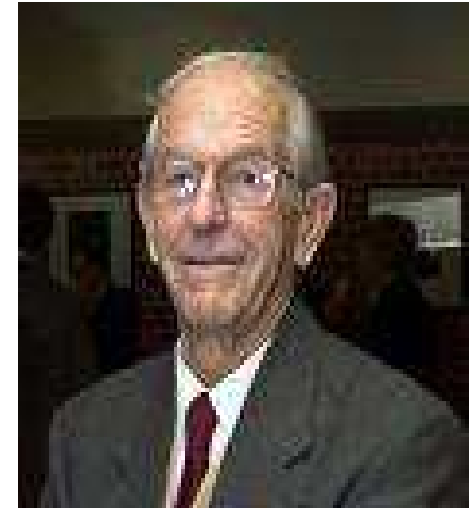
Sanger – Coulson – (Nicklen)

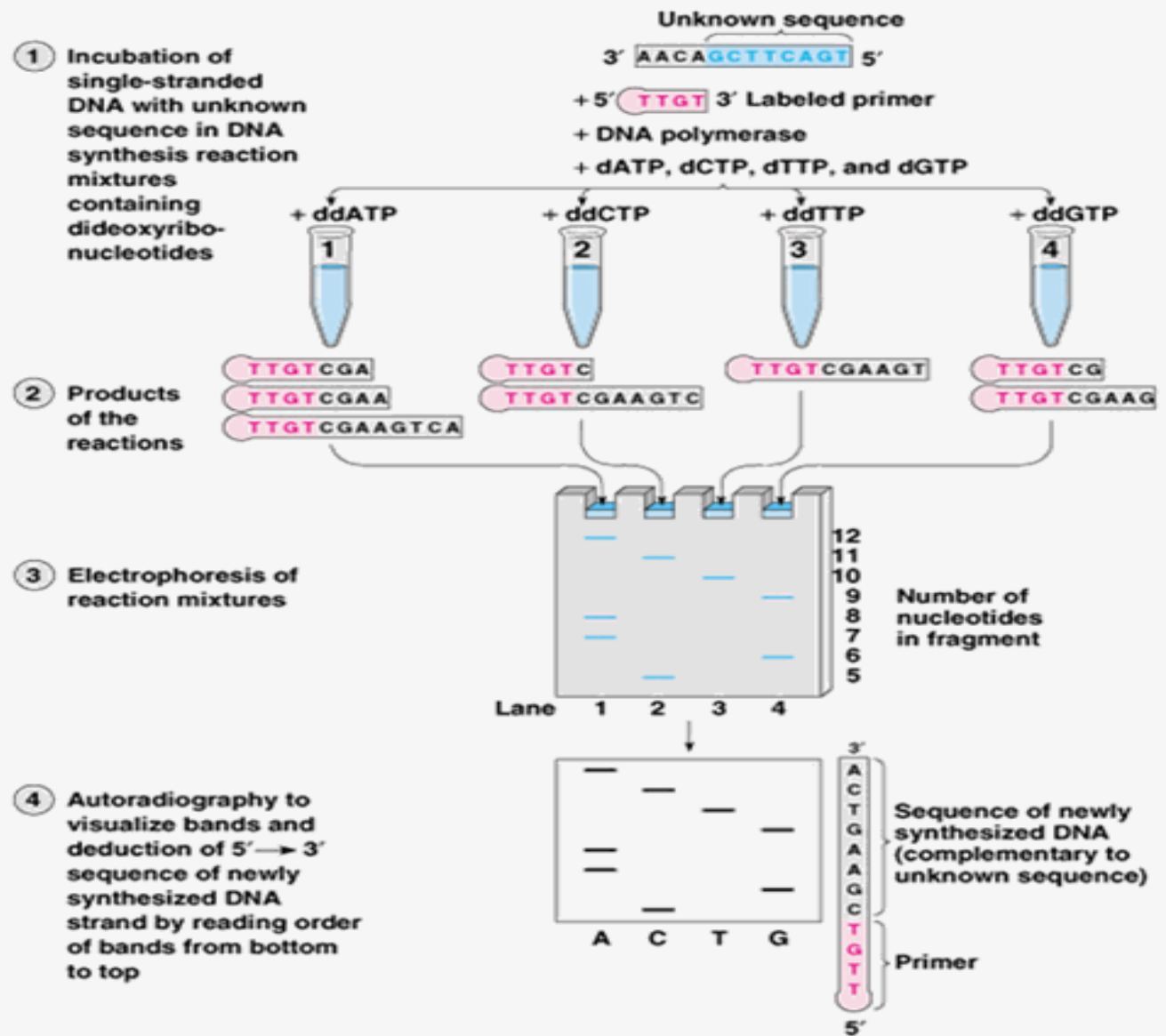
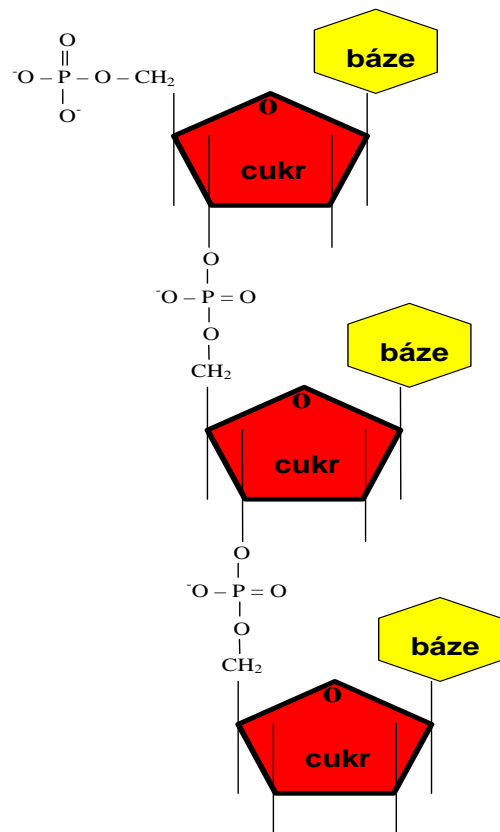
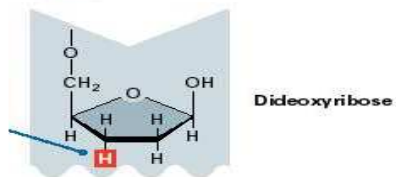
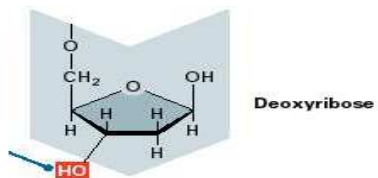
- Syntéza komplementárního vlákna z ss DNA templátu – restriční fragmenty (reakční pufr; dNTPs; DNA pol I – Klenowův fragment, T7 DNA pol, Taq DNA pol)
- Radioaktivní značení vznikající molekuly [α -³²P]dATP, [α -³⁵S]dATP (alkalická fosfatáza, polynukleotid kináza)
- Složitá inkubace ve vícero krocích (annealing, amplifikace)
- Přidání terminátorů ddNTPs – postupní terminace (poměr dTTP:ddTTP)
- Nutnost terminace reakce (formaldehyd, chelatační činidla, barviva)
- Elektroforéza – 6-8% PAGE + TBE (TEMED, močovina, bis-akrylamid)
- Autoradiografie vysušeného gelu (24-48 hod) a následní detekce
- Radioaktivní látka, 30 nt od primeru – max 400 nt

- Prodloužení délky čteného vlákna
- Modifikace chemie (nahrazení radioaktivního značení)
- Modernizace metod analýzy syntetizovaných fragmentů, automatizace

SANGEROVA metoda

- Nejpoužívanější způsob sekvenování
- Objeveno Frederickem Sangerem - 1977
- Nobelova cena - 1980





Nahrazení radioaktivního značení fluorescenčními barvičkami

- Oligo – hybridizační sondy
- Radioaktivní nuklidy: ^3H , ^{32}P , ^{35}S , ^{125}I
- Detekce záření na scintilačním fotometru nebo autoradiografií na RTG filmu
- 3' i 5', celé fragmenty: DNA I pol, Klenowův fragment, T4 DNA pol, T4 polynukleotid kináza, alkalická fosfatáza (BAP, CIP)

- Fluorochromy – široké spektrum a využití v biologii
- 6-FAM, NED, PET, ROX, HEX, VIC, JOE, LIZ, BigDyes
- Detekce fluorescenčního záření: laser + indukční a emisní spektrum fluorochromu – excitace fluorochromu – detekce přes optický systém (CCD kamera; vzduchem chlazený CCD čip) – virtuální filtrování – vlnová délka se odečítá pouze v oblasti spektrálního maxima
- Ovlivnění mobility fragmentů

Radionuklid	Poločas rozpadu	Typ	Záření Max energie	Účinnost	
				voda	vzduch
³² P	14,3 dní	β	1,71 MeV	600 cm	7,8 mm
³⁵ S	87,4 dní	β	0,167 MeV	26 cm	340 μm
¹²⁵ I	60 dní	γ	0,35 MeV	1,5 cm	20 μm
³ H	12,43 roka	β	0,018 MeV	0,5 cm	5,5 μm

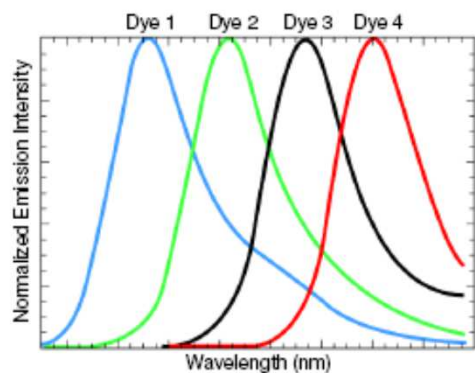


Figure 7 Emission spectra of the four BigDye dyes, where Dye 1 = Big-d110, Dye 2 = R6G, Dye 3 = Big-dTAMRA, and Dye 4 = Big-dROX

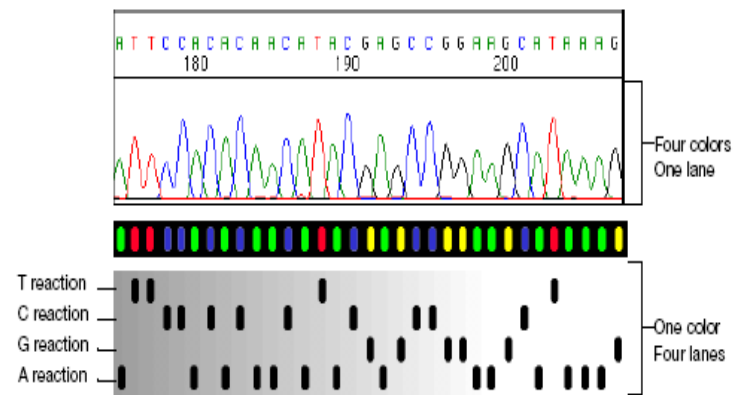
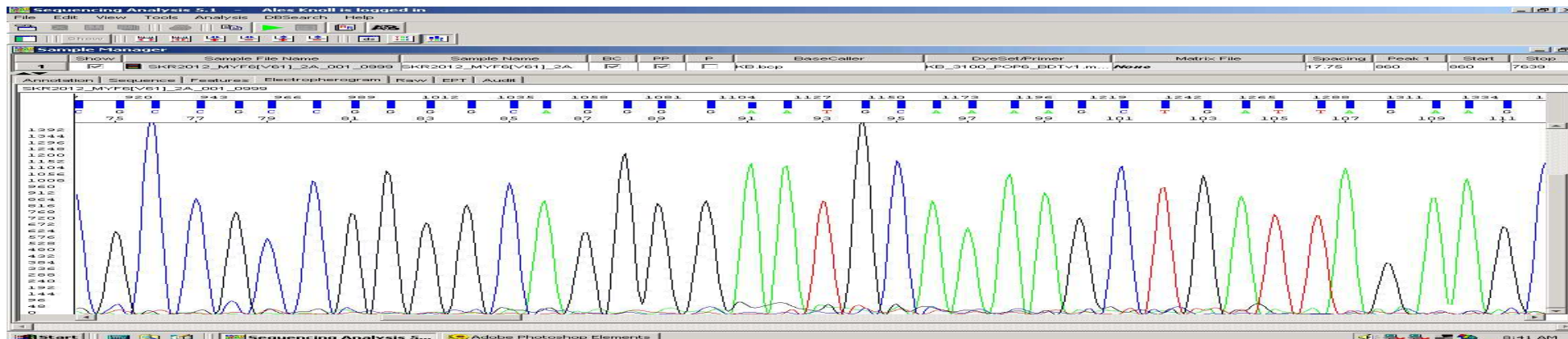


Figure 8 Fluorescent sequencing compared with radioactive sequencing



454- pyrosekvenování

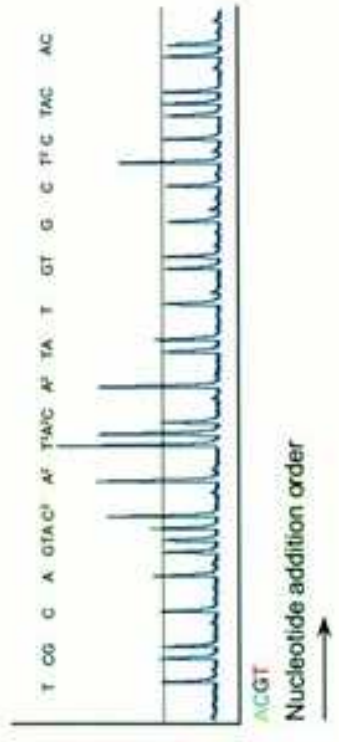
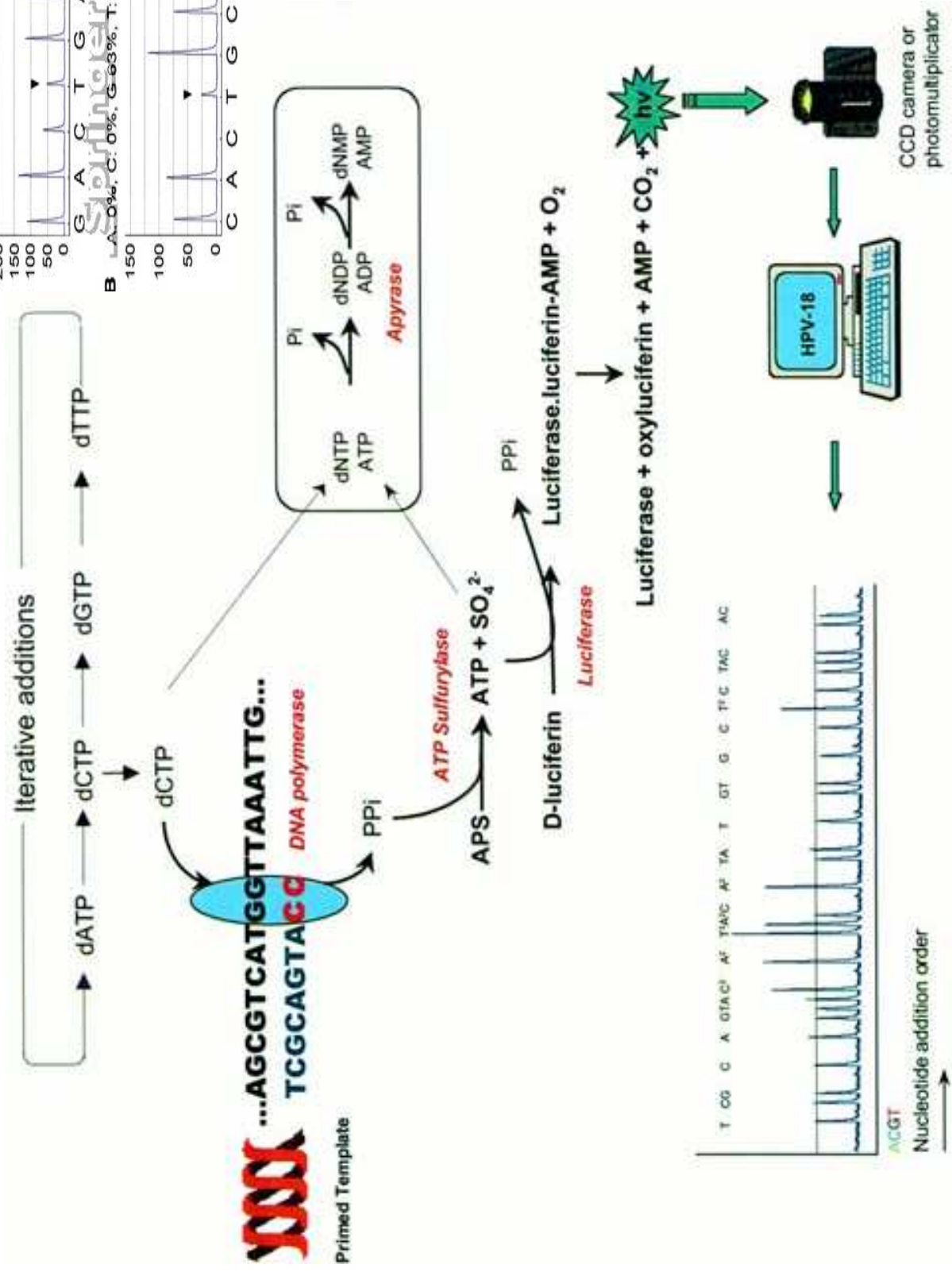
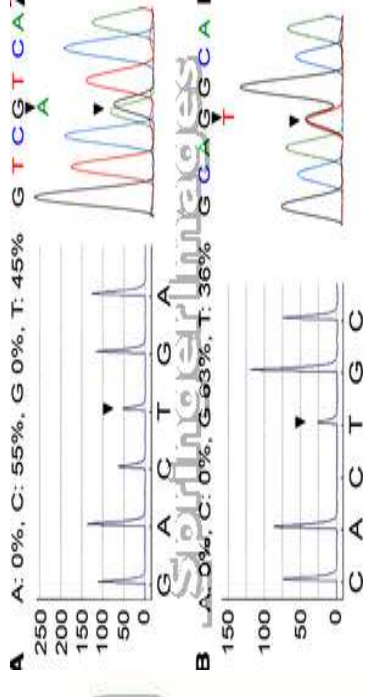
- 454 Life Sciences - komercializace
- Sekvenování druhé generace
- Celogenomové
- 4 enzymový systém
 - DNA polymeráza
 - ATP sulfuryláza
 - Luciferáza
 - Apyráza
- **Detekce nukleotidu začleněného do nově-syntetizovaného vlákna pomocí luminiscence**
- Roche – GS FLX Titanium, GSJunior

SOLID chemie

- Solid – Life Technologies- Applied Biosystems
- **Detekce fluorescence**
- Kombinace dvou nukleotidů, vícero primerů
- Galaxy software

Ion Torrent technologie

- Nejnovější technologie
- Celogenomový
- Personální využití – PGM systém
- **Detekce změny pH**



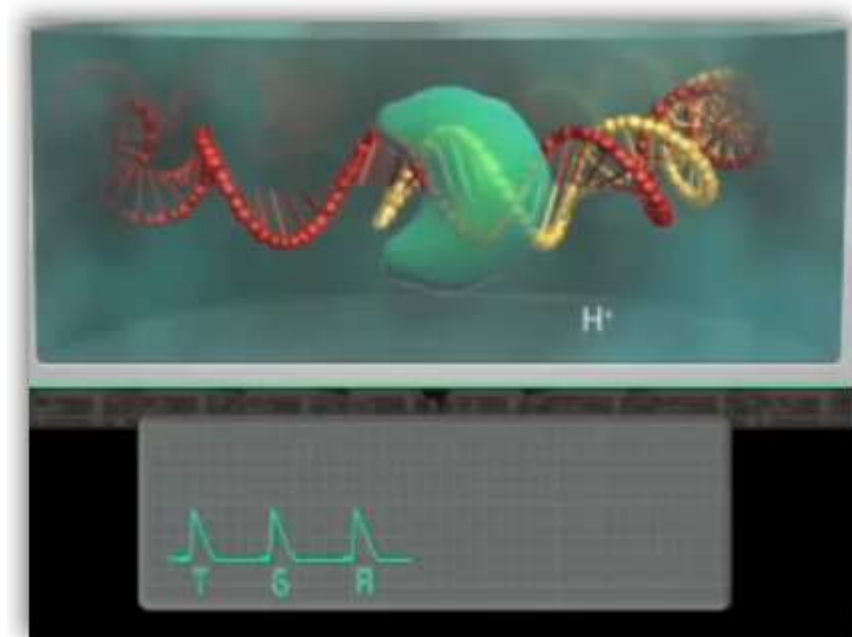
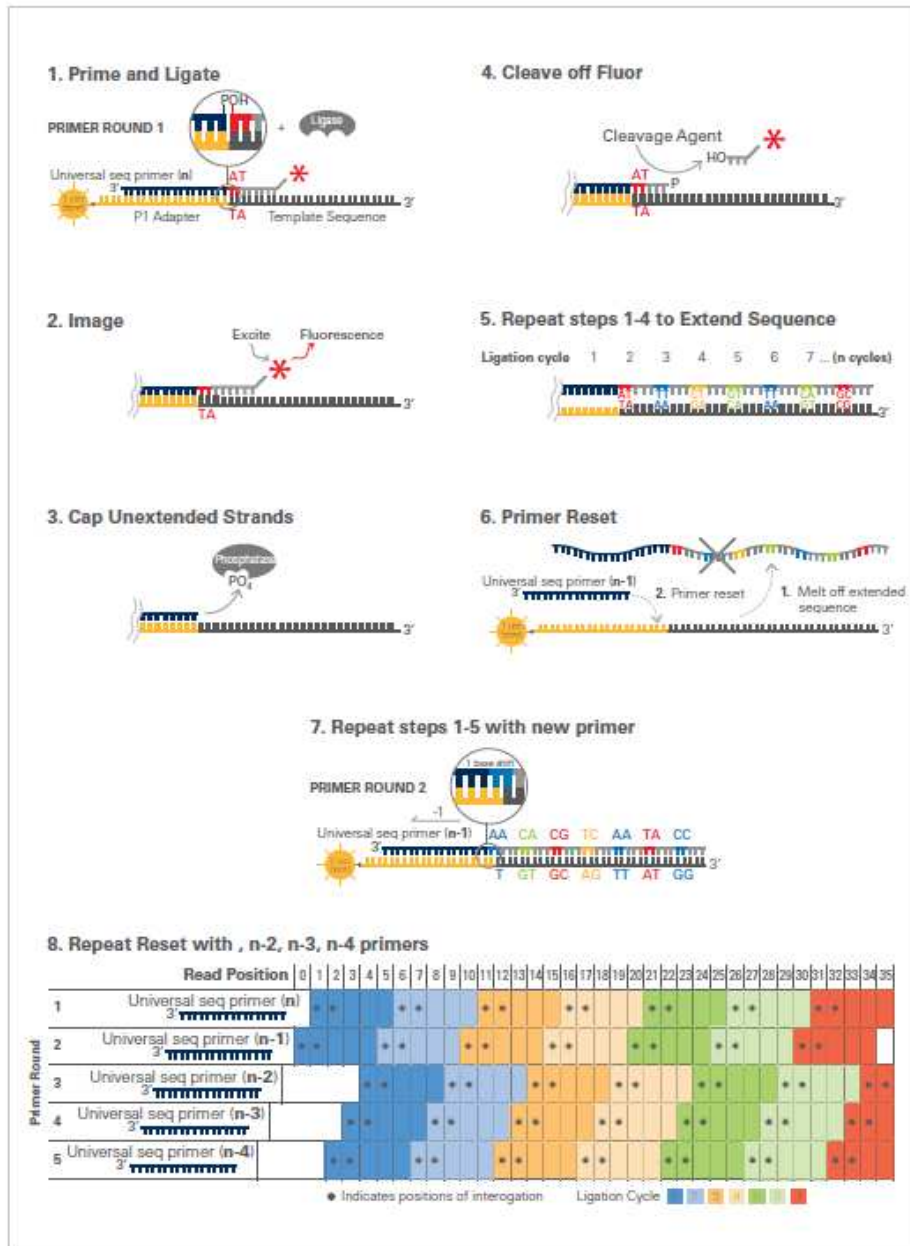
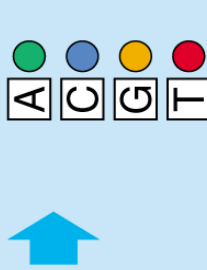


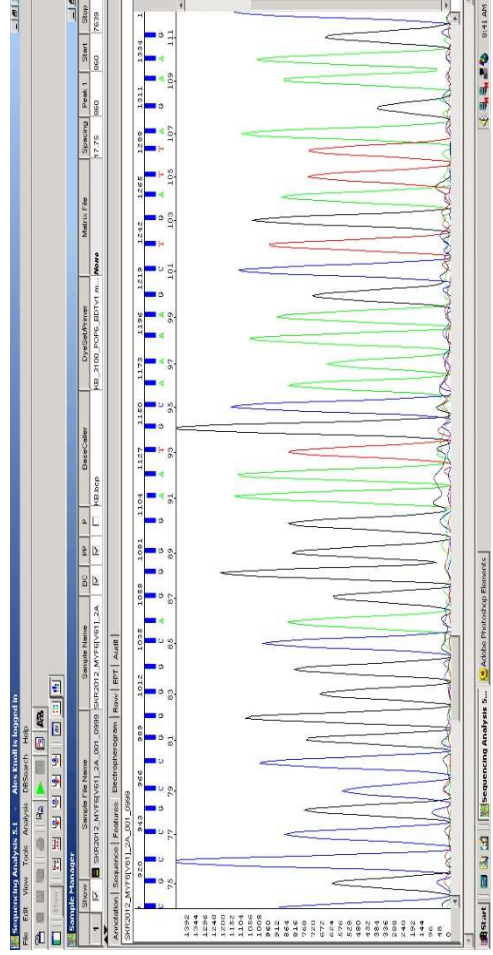
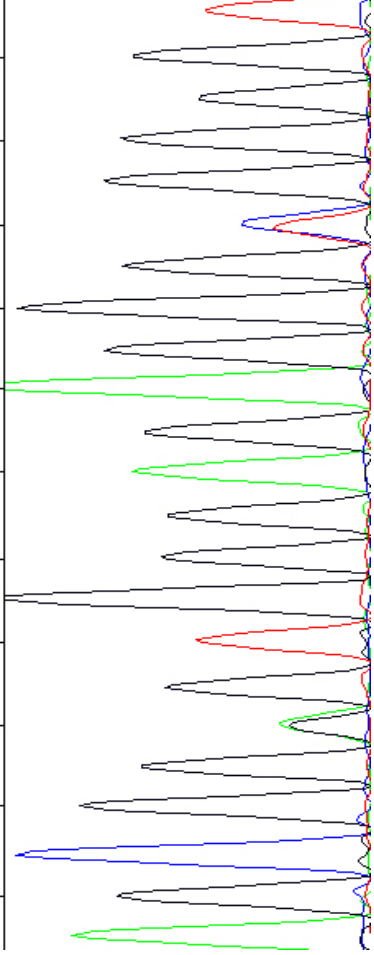
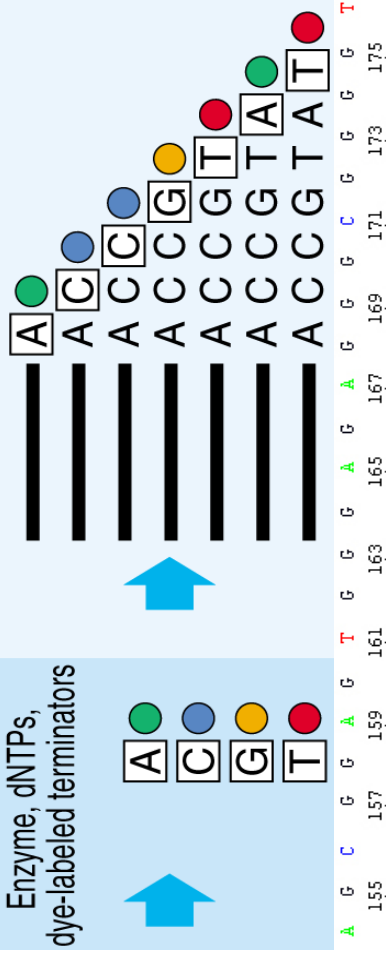
Figure 1: SOLiD™ System – Sequencing by ligation using di-base labeled probes

EXTENSION

Enzyme, dNTPs,
dye-labeled terminators



PRODUCTS



2nd Base

A C G T C A T C C A T C G

A C G T C A T C C A T C G

1st Base

- 1 Color ≠ 1 Base
- Each Color = Info from 2 Bases

Discriminate Polymorphisms From Errors

Reference Sequence

SOLID read and quality format

```

>1279_22_371_F3
T0133231.3220220312223121011022022023113131.1121021
>1279_35_1729_F3
T101101331003203111312122132211020213102010310331113
b
>1279_22_371_F3
23 20 5 13 11 22 28 -1 16 8 14 21 8 16 5 18 23 2 27 18 5 8 3
>1279_35_1729_F3
24 18 13 23 7 20 7 13 7 5 8 3 11 6 26 28 20 5 25 10 8 5 3
  
```


Přístrojové vybavení

- Klasická vertikální elektroforéza
- Gelové sekvenátory – plošné PAGE gely, ruční příprava
 - Applied Biosystems, Bio-Rad, Beckman
- Kapilární sekvenátory – komerčně dostupné polymery – denaturační / nedenační, automatické „nanášení“ vzorků, elektroforéza v kapiláře
 - (Applied Biosystems, Amersham Pharmacie BioTech, Beckman)
 - ABI PRISM 310, 3100, 3100-*Avant*, 3730, ABI 3500 Genetic Analyzer; MegaBACE 500, 750, 1000, 15000, 4000; CEQ 8000, CEQ 8800

- 1986 – 1. sekvenátor (Perkin-Elmer)
- Gelové poloautomatické sekvenátory
- Vývoj úrovně automatizace – princip kapilární elektroforézy
- 1 – 4 – 8 – 16 – 24 – 96 kapilár
- Vývoj ovládacího softwaru
- Vývoj kvality, kvantity a rychlosti zpracování vzorků
- Sekvenování **první generace** – **Sanger** – do 1000 bp
- Sekvenování **druhé generace** – **celogenomové** – paralelní sekvenování amplifikovaného DNA templátu – 3 Gbp/run → 20 Gbp/run → 100 Gbp/run
- Sekvenování **třetí generace** – rychlé a dlouhé čtení – **sekvenování jedné molekuly**



ABI PRISM®
310 Genetic

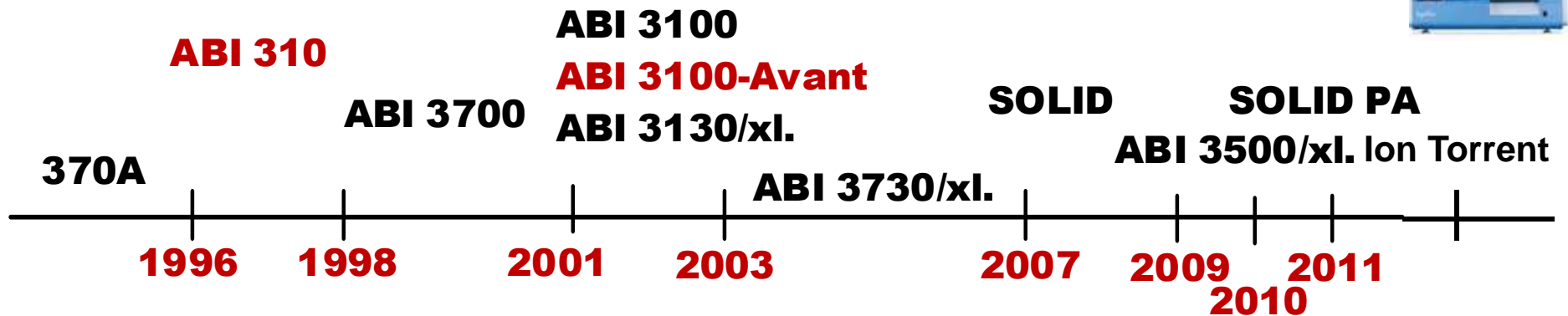
Applied Biosystems
3130 Genetic Analyzer

Applied Biosystems
3130xl Genetic Analyzer

Applied Biosystems
3730 DNA Analyzer

Applied Biosystems
3730xl DNA Analyzer

Key applications: *De novo* sequencing • Resequencing • Mutation/heterozygote detection
 SNP genotyping • Relative fluorescent quantitation • Microsatellite analysis • AFLP® analysis
 Methylation analysis • T-RFLP analysis • MLST • BAC fingerprinting • SAGE™





**SOLID 3 Plus System
Applied Biosystems**

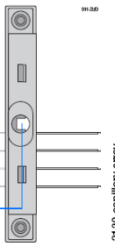
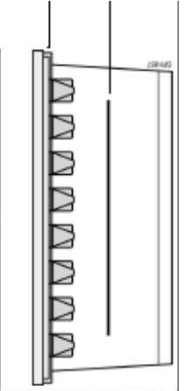


Illumina Genome Analyzer IIx

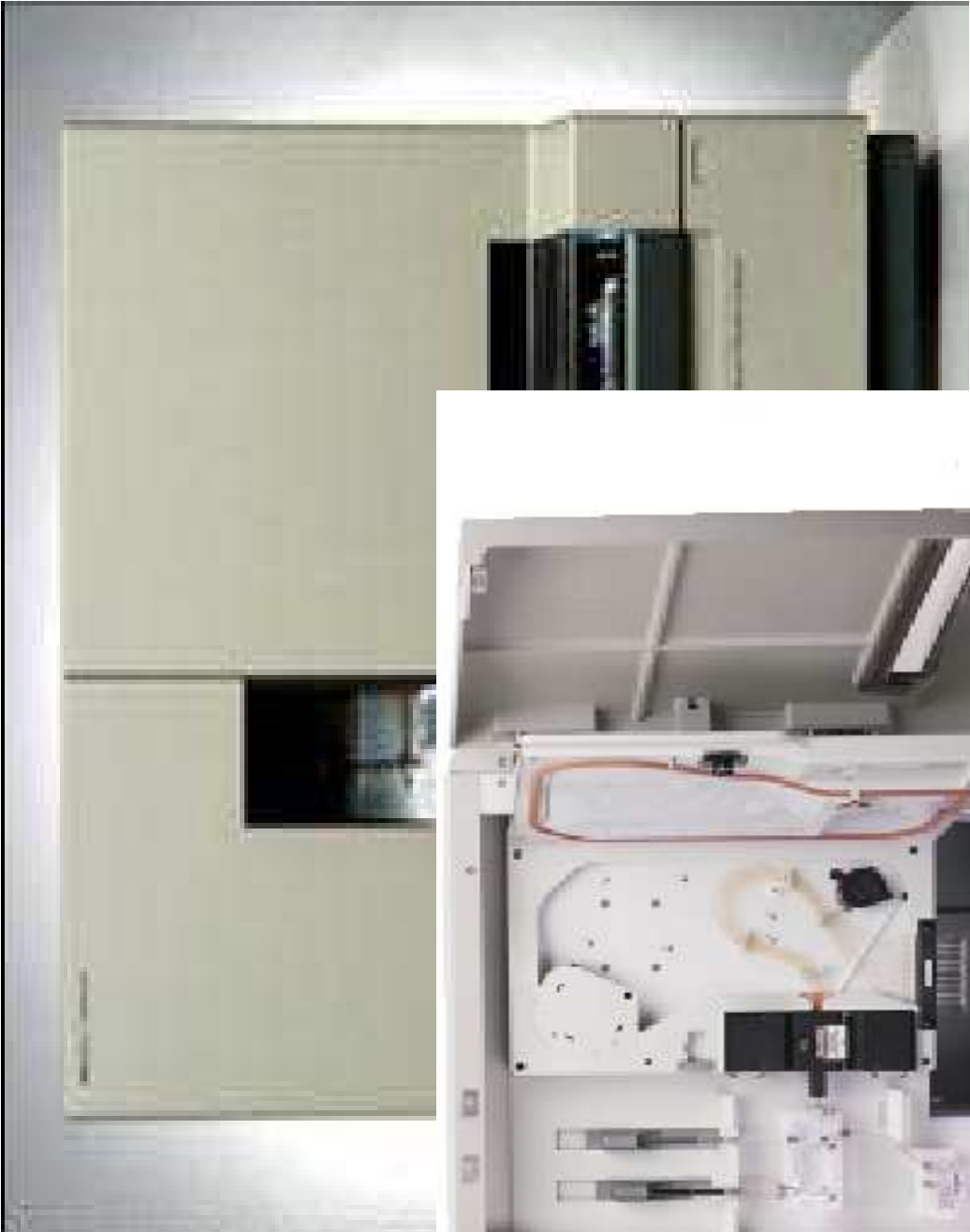
CEQ 8000 Beckman Coulter



**Genome Sequencer FLX System
Roche Diagnostics**



1100 POPs capillary array



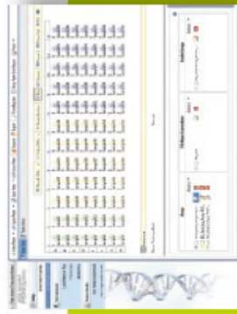
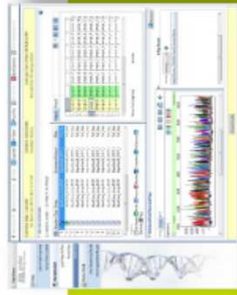
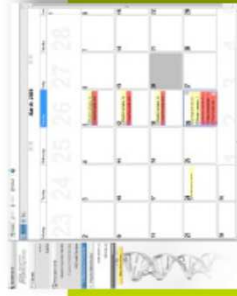


Plate Setup



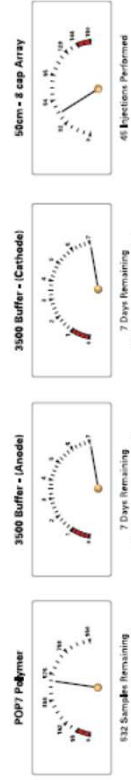
Monitor Run



Maintenance Scheduling Calendar



Quick Start Run
 Create New Plate
 Create Plate from Template
 Enter Existing Plate
 View Run Results
 Maintain Instrument



Capillary Array



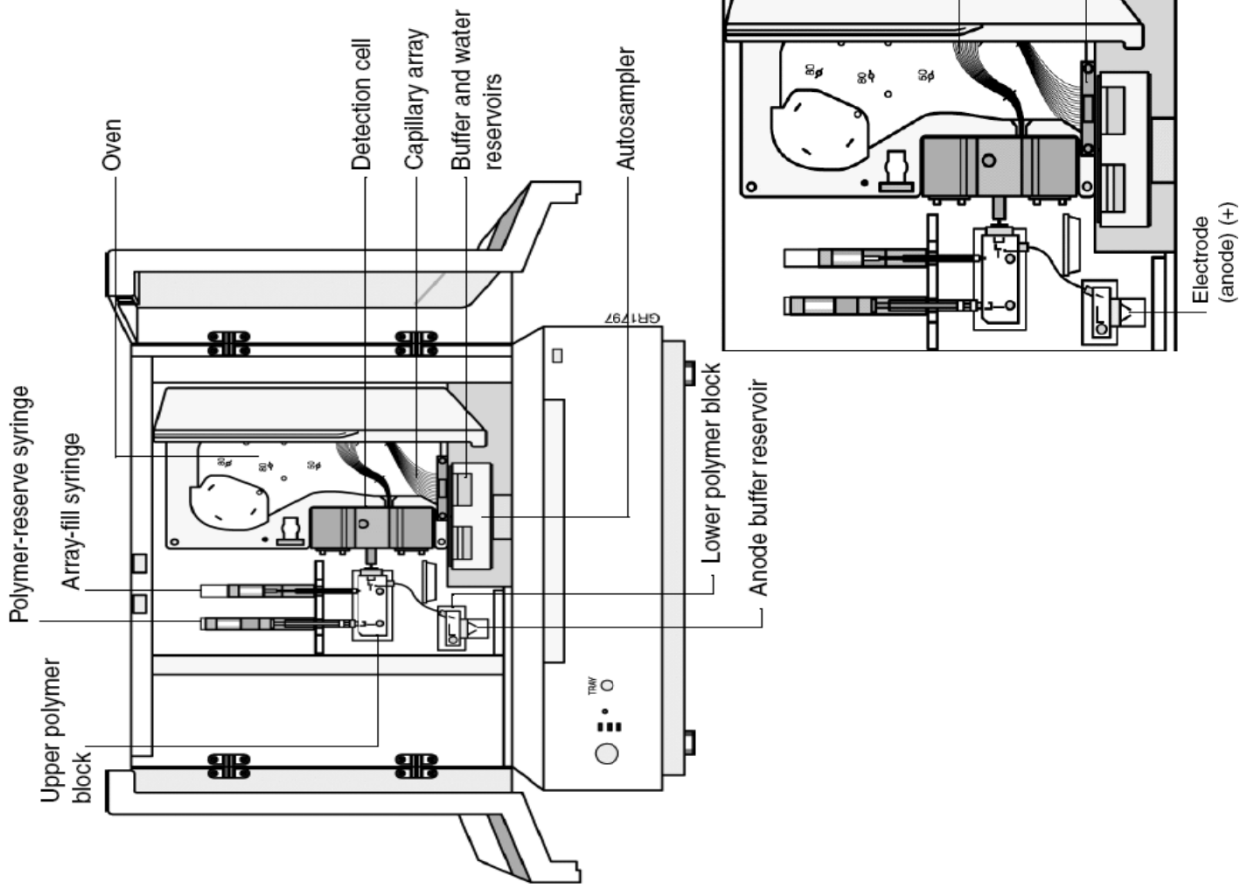
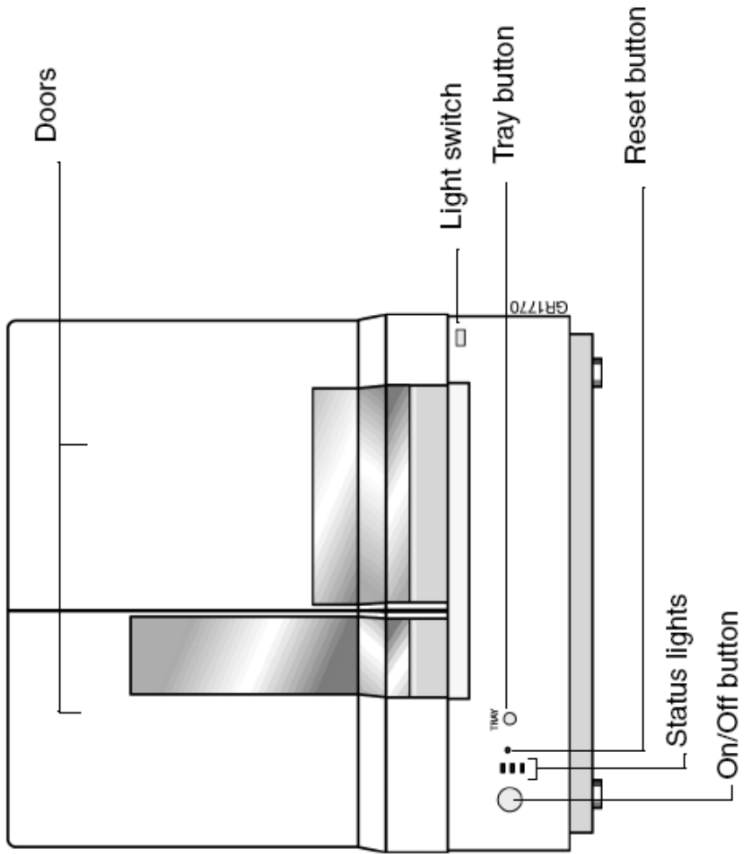
Cathode Buffer Container



Anode Buffer Container

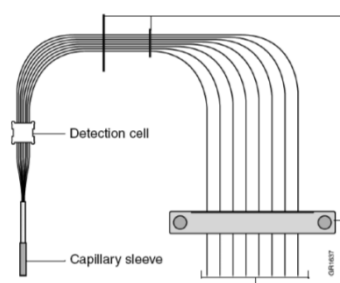
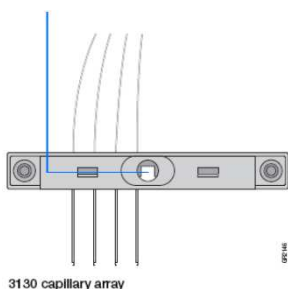
ABI Prism 3100-Avant Genetic Analyzer a metoda sekvenování

- Automatický autosampler
- Plata pro 96 vzorků
- 4 kapiláry – paralelní runy
- Píčka
- Detekční prostor (laser, optika, CCD kamera, okénko kapiláry)
- Katody a anoda
- Elektroforetický pufr
- Dávkování polymeru – systém stříkaček
- Ovládací software



Možnosti ABI Prism 3100-Avant

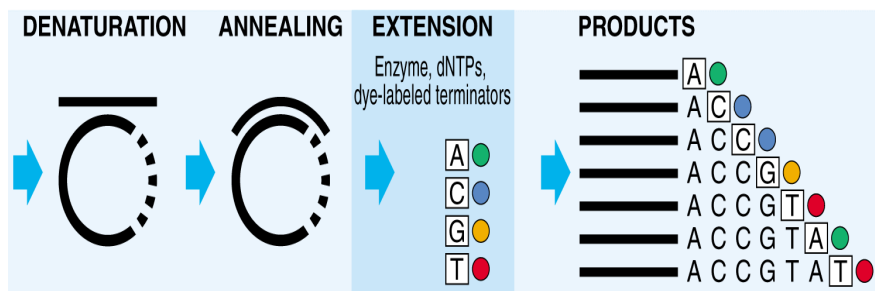
Capillary Length	Polymer	Application	Run Module	Run Time	Resolution	Performance	KB Q20 LOR**
22 cm	POP-4™	High throughput SNP analysis	SNP22_POP4	15 min	250 bp	0.50 SD†	--
		High throughput, small size fragment analysis	FragmentAnalysis22_POP4	20 min	400 bp		
36 cm		Standard SNP analysis	SNP36_POP4	30 min	250 bp	0.15 SD†	--
		Standard fragment analysis	FragmentAnalysis36_POP4	45 min	400 bp		
		Ultra rapid sequencing	UltraSeq36_POP4	40 min	500 bp	98.5% *	400 bp
50 cm	POP-6™	Rapid sequencing	RapidSeq36_POP6	1 hr	500 bp	98.5% *	500 bp
		Standard sequencing	StdSeq50_POP4	1 hr 40 min	--		--
	POP-4™	Long fragment analysis	FragmentAnalysis50_POP4	1 hr 5 min	500 bp	0.15 SD†	--
		Long fragment analysis	FragmentAnalysis50_POP6	1 hr 30 min			--
		Standard sequencing	StdSeq50_POP6	2 hr 30 min	650 bp	98.5% *	600 bp
80 cm	POP-4™	Long read sequencing	LongSeq80_POP4	3 hr 40 min	950 bp		700 bp



Princip metody sekvenování na ABI

Postup: purifikace DNA templátu – PCR amplifikace a přečištění produktu – cyklické sekvenování – přečištění sekvenační reakce – kapilární elektroforéza – analýza dat

Dye terminator chemistry



Templát – koncentrace, čistota

Primer - specifita

Pufr

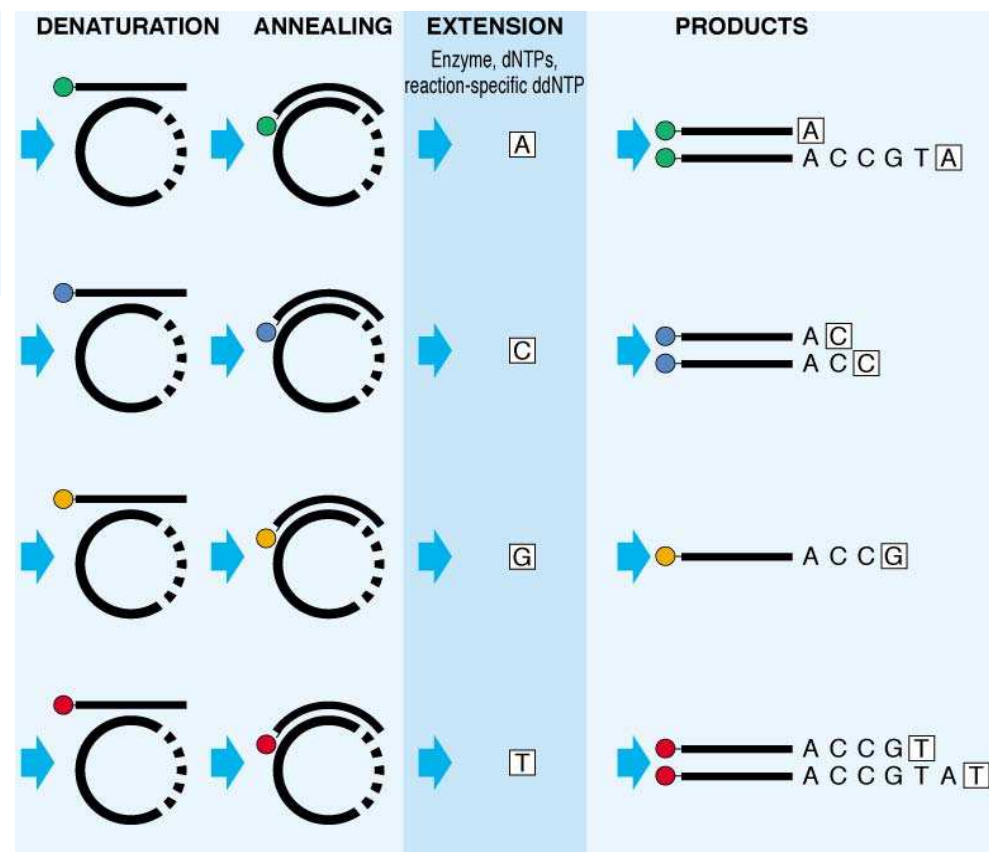
dNTP

ddNTP

Taq DNA polymeráza

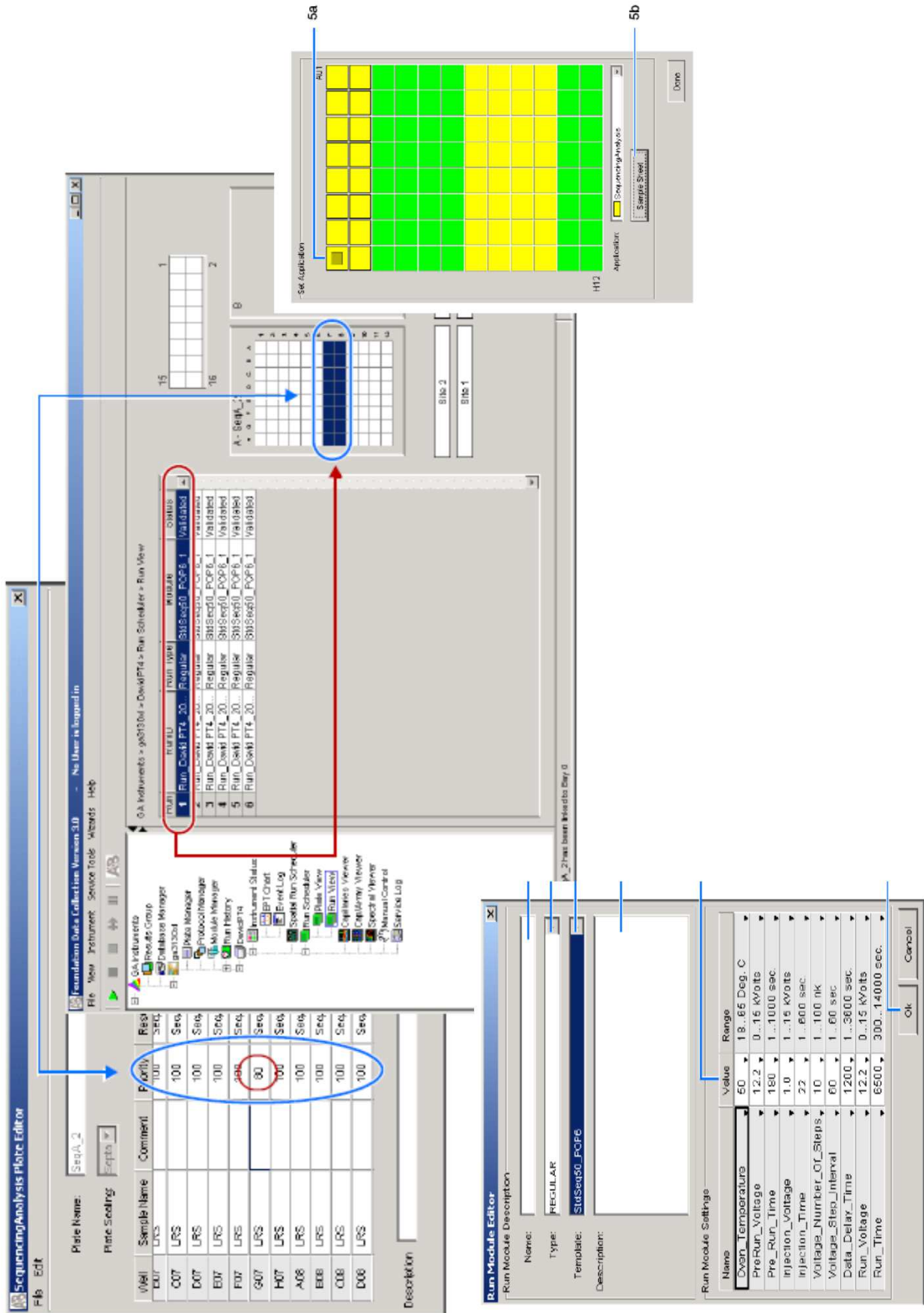


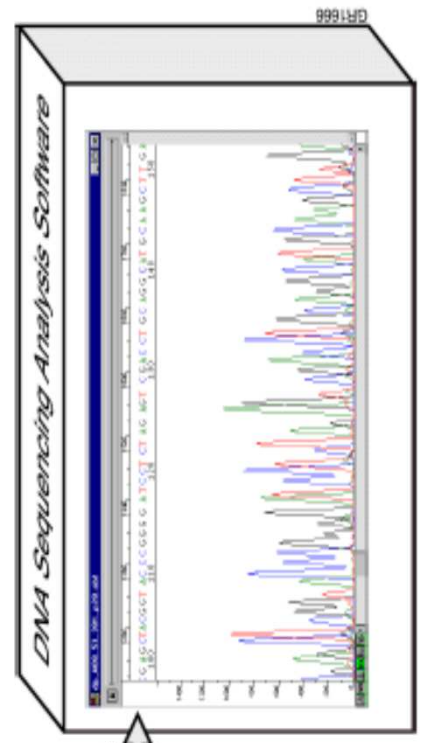
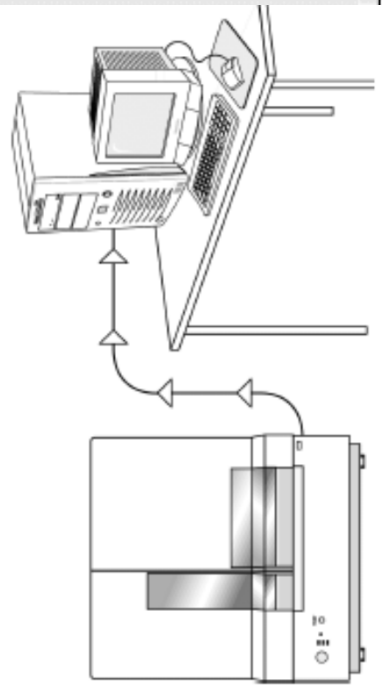
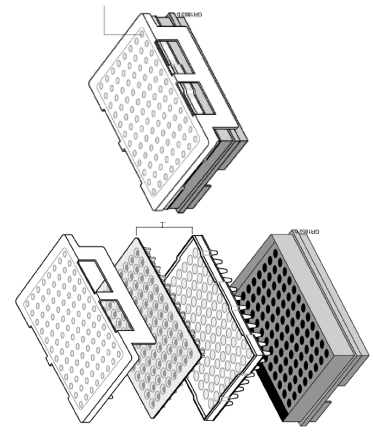
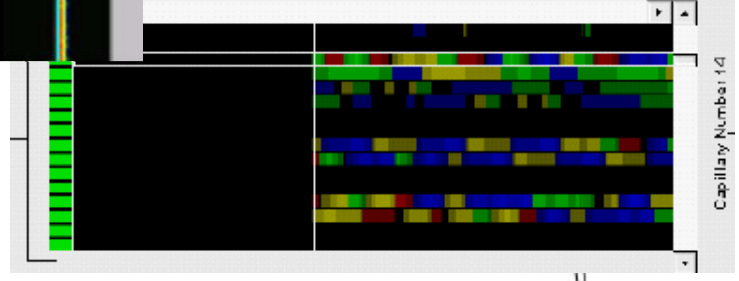
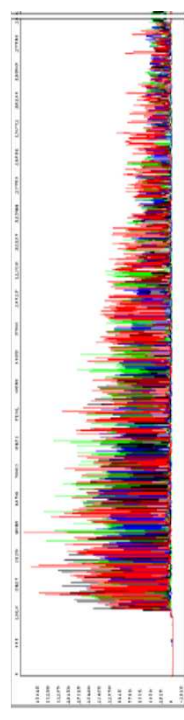
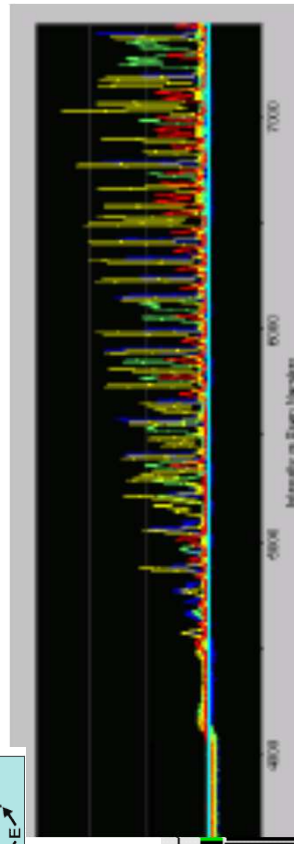
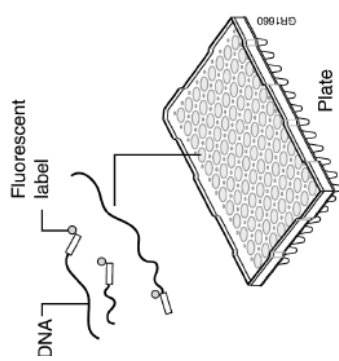
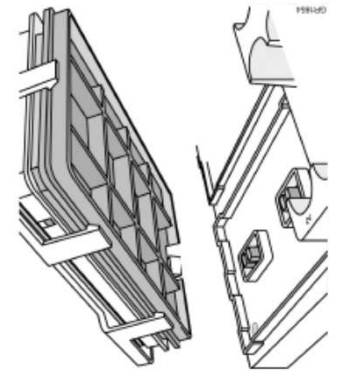
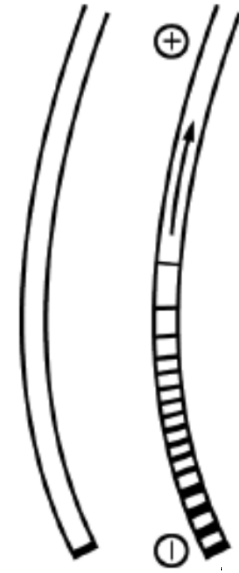
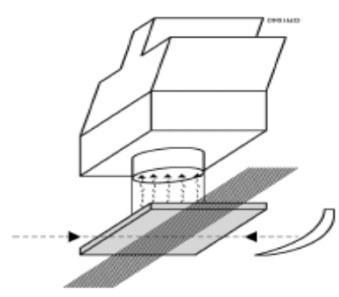
Dye primer chemistry



Princip práce stroje

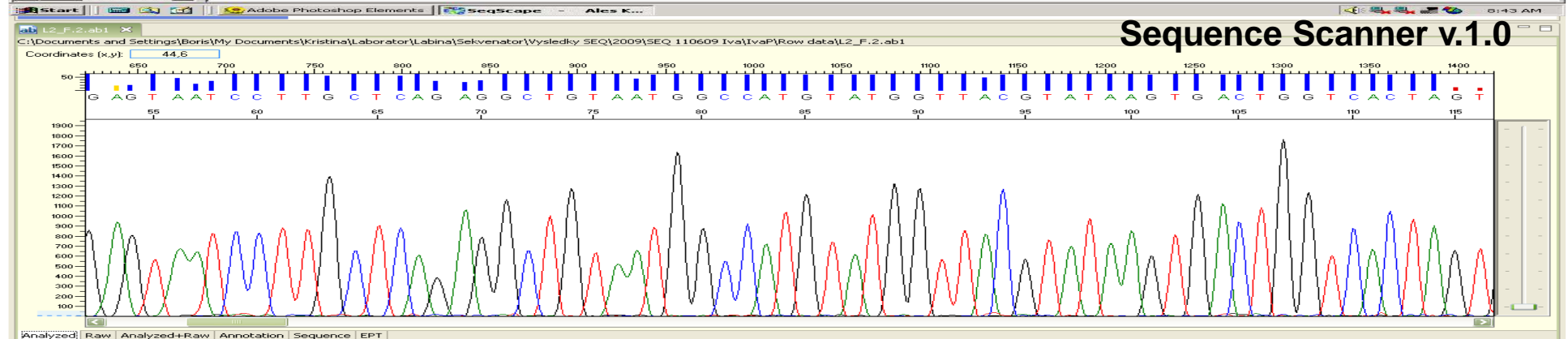
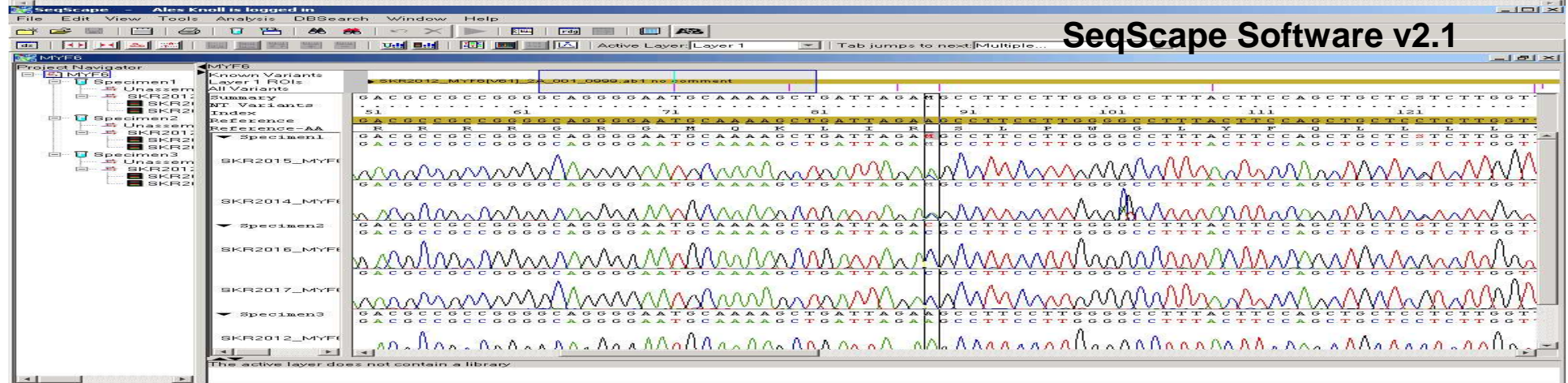
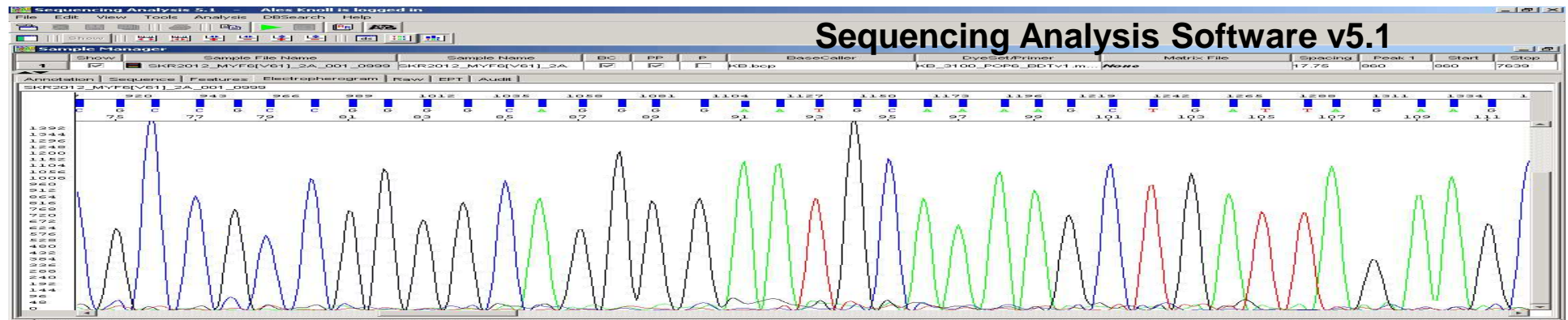
- Ovládání softwarem – DataCollection
- Elektrokinetická injektáž – objem vzorku zůstává nezměněn
- Pohyb fragmentů DNA gelem (polymerem) v elektrickém poli
- Definování správných podmínek runu (modul) – bere v úvahu směs použitých fluorochromů, délku kapiláry (50-80 cm), polymer (POP6)...
- Detekce emise fluoroforu při přechodu detekčním okénkem
- Převod dat: spektra – raw data – elektroforetogram
- Vyhodnocení a analýza





Data Export

Capillary Number 14



Aplikace a využití metody sekvenování

- Sekvenování *de novo*
- Resekvenování
- detekce mutací – SNP, INDELS (nutné rozklonování PCR produktů k detekcím jednotlivých alel)

- evoluce genů
- vnitrodruhové studie
- mezidruhové studie

Sequencer
 File Edit Select Contig Sequence View Window Help

Contig[0001]

Overview Summary Cut Map Find Show Chromatograms Re-aligner

X6_71.2
 X6_619.2
 X6_20
 X6_14

250 260 270 280 290 300 310 320 330 340 350 360 370
 ACACGATCCCAAAC TTCTGCAGTCAG GAGAGCTCAGGTGG TGCATATGCAAA CAATGCTGAA T: CAGGCAGCTATGCTGATAAAAACAGGTACAGCACAGGCTTCTGATCCCTCCTC
 ACGACGATCCCAAAC TTCTGCAGTCAG GAGAGCTCAGGTGG TGCATATGCAAA CAATGCTGAA T: CAGGCAGCTATGCTGATAAAAACAGGTACAGCACAGGCTTCTGATCCCTCCTC
 ACGACGATCCCAAAC TTCTGCAGTCAG GAGAGCTCAGGTGG TGCATATGCAAA CAATGCTGAA CT: ATATCAGGAGCTATGCTGATAAAAACAGGTACAGCACAGGCTTCTGATCCCTCCTC
 ACGACGATCCCAAAC TTCTGCAGTCAG GAGAGCTCAGGTGG TGCATATGCAAA CAATGCTGAA ATCAG: CAGGCAGCTATGCTGATAAAAACAGGTACAGCACAGGCTTCTGATCCCTCCTC

28 frag bases
 & 7 consensus
 bases selected
 at consensus
 position 319

Chromatograms from Contig[0001]

X6_71.2 Fragment bases #918-974
 C A T A C C I G C A A C A K A A I G C T I G A A M T M W R W C A G G C I A T I C G C I G A I A A A A
 C A T A C C I G C A A C A K A A I G C T I G A A M T M W R W C A G G C I A T I C G C I G A I A A A A A

X6_619.2 Fragment bases #265-281
 A T A C C T I G C A A C A I A A I G C T I G A A C T I A I A I C A G G C I A T I C G C I G A I A A A A
 A T A C C T I G C A A C A I A A I G C T I G A A C T I A I A I C A G G C I A T I C G C I G A I A A A A A

X6_20 Fragment bases #249-265
 C A T A C C I G C A A C A I A A I G C T I G A A C T I A I A I C A G G C I A T I C G C I G A I A A A A
 C A T A C C I G C A A C A I A A I G C T I G A A C T I A I A I C A G G C I A T I C G C I G A I A A A A A

X6_14 Fragment bases #319-325
 A T A C C T I G C A A C A I A A I G C T I G A A C T I A I A I C A G G C I A T I C G C I G A I A A A A
 A T A C C T I G C A A C A I A A I G C T I G A A C T I A I A I C A G G C I A T I C G C I G A I A A A A A

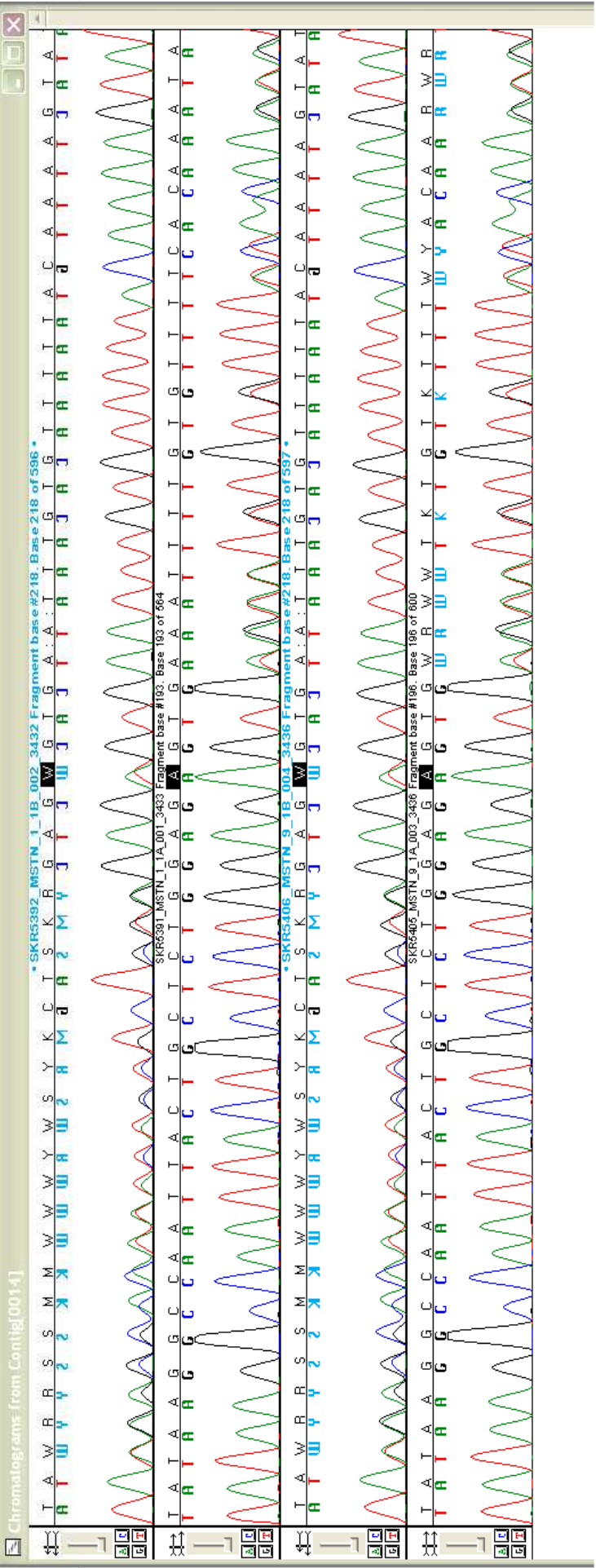
Contig[0014]

Overview Summary Cut Map Find Show Chromatograms ReAligner Maximize

4 SKR5392_MSTN_1_1B_002_3432 TTCTCTTGTGTTTACAAAAGTATCCCTCA
 4 SKR5391_MSTN_1_1A_001_3433 TTACCCTTAAGCTTTGGATTTGGATTTCCACCCAAAAGATAAAGGCCAAATTAAGTCTCTGGAGACTGAAATTTGGTTTCCACAAATATCCCTCA
 4 SKR5406_MSTN_9_1B_004_3436 TCGCTTAACTGGACTTTGAAAGCTTTTGGATTTGGATTTCCACCCAAAAGATAAAGGCCAAATTAAGTCTCTGGAGACTGAAATTTGGTTTCCACAAATATCCCTCA
 4 SKR5405_MSTN_9_1A_003_3438 TTACCCTTAAGCTTTGAAAGCTTTTGGATTTGGATTTCCACCCAAAAGATAAAGGCCAAATTAAGTCTCTGGAGACTGAAATTTGGTTTCCACAAATATCCCTCA

44 frag. bases selected at consensus position 218

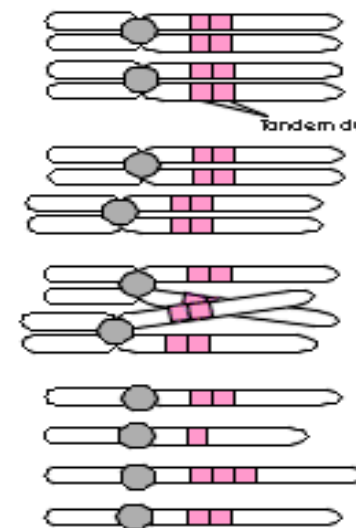
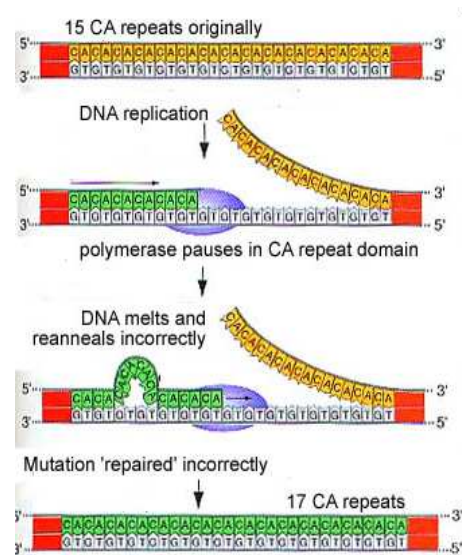
30 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200 1210 1220 1230 1240 1250
 TTACCCTTAAGCTTTGAAAGCTTTTGGATTTGGATTTCCACCCAAAAGATAAAGGCCAAATTAAGTCTCTGGAGACTGAAATTTGGTTTCCACAAATATCCCTCA



Mikrosatelity – definice a využití

- STR, SSR – jednoduché motivy, VNTR – složité motivy
- Různé typy motivů v tandemovém opakování
 - Mononukleotidový motiv – jednoduchá repetice (polyA) **(A)_n**
 - Dinukleotidový motiv – nejčastější v panelech v určování původu hospodářských zvířat **(GT)_n**
 - Trinukleotidový motiv – vhodnější na odečet (panely u psů) – kombinace s di-nt motivy v panelech **(GTC)_n**
 - Tetranukleotidový motiv – panely pro určování původu u zvířat i lidí, vhodné na odečet, ne tak časté **(ATCT)_n**
 - Složené motivy – složité sekvence – zejména u nižších živočichů
 - Bythinella
GA(CA)₃(GACA)₄(GA)₂(CA)₂(GA)₂₂CA(GA)₇CA(GA)₄CA(GA)₄CA(GA)₇
 - Gammarus
[(CAT)₂CACC(CAT)₂C]₂(CAT)₂CACC(CAT)₅G(CAT)₂CACC(CAT)₂

- Polymorfismus na základě variability opakování – vysoce polymorfní
- Multialelické – zdroj genetické variability
- Klasické Mendelovské křížení a segregace
- Vznik nových alel – DNA pol. slippage, chyby v crossing-overu během meiózy
- Zejména v nekódujících oblastech – intergenové oblasti (genetický balast) a intragenové oblasti (UTR, introny)



Funkce a využití MS

- Funkce neověřená - ochotně rekombinují, tvoří sekundární struktury (vliv na replikaci DNA a buněčný cyklus), možná regulace genové aktivity (transkripce a translace)
- Využití zejména:
 - v populačních studiích (struktura populace, fylogenetické analýzy, geografická vazba)
 - forenzní genetika (15 MS+amylogenin)
 - identifikace jedince (paternita, parentita, původ – i u zvířat – nutnost stanovení genetického profilu)
 - diagnostika a určování onemocnění (zvířata i lidi, vazbové markery)
 - konstrukce vazbových map (potřeba rodin a populací – existují již komerční kity např. ABI Prism Human Linkage Mapping Site)

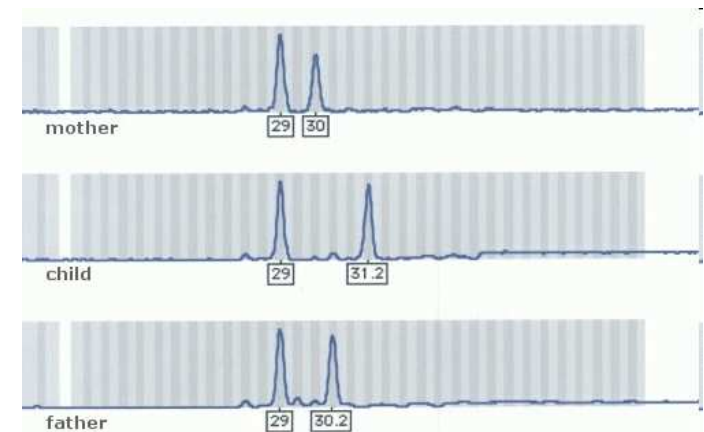
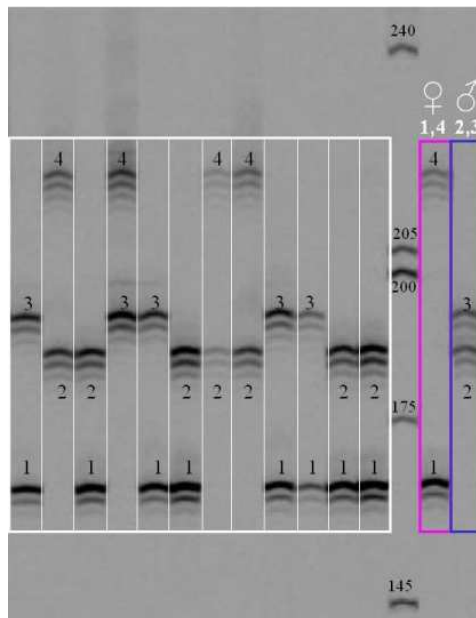
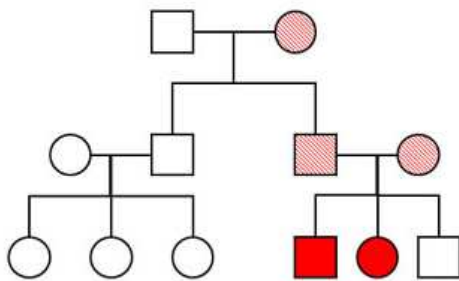
Velikost alel mikrosatelitních markerů a jejich variabilita

- Variabilita v opakování motivu – variabilní délka amplifikovaného fragmentu
- Možná modifikace (mutace) v místě nasedání primeru – falešná homozygotita, nulové alely
- Možné chyby při PCR amplifikaci – sklouznutí DNA polymerázy, amplifikace nespecifického místa
- Přidávání adeninu na konec fragmentu
- Nestabilita při amplifikaci – polymeráza dělá čím dál tím kratší fragmenty

CGTAGCCTTGCATCCTTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTATCGGTACTACGTGG
CGTAGCCTTGCATCCTTCTCTCTCTCTCTATCGGTACTACGTGG
CGTAGCCTTGCATCCTTCTCTATCGGTACTACGTGG

Historie hodnocení variability mikrosatelitních markerů

- Genealogie – tvorba rodokmenů
- PCR amplifikace variabilních míst v genomu – horizontální gelová elektroforéza (EtBr)
- Fragmentační analýza kapilární gelovou elektroforézou (fluorofory)

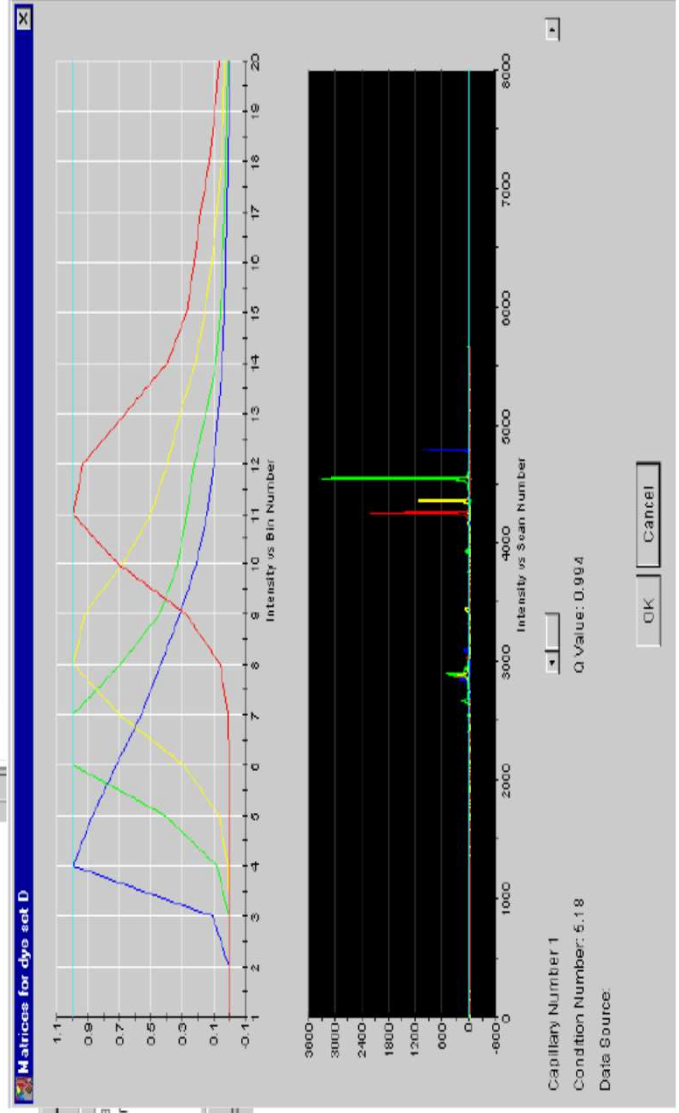
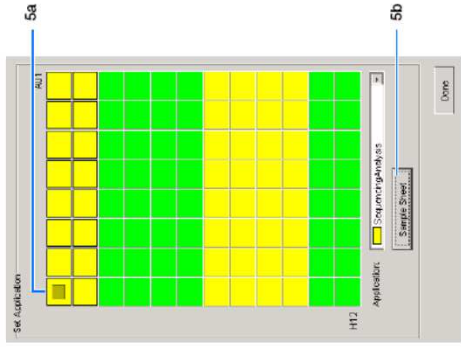
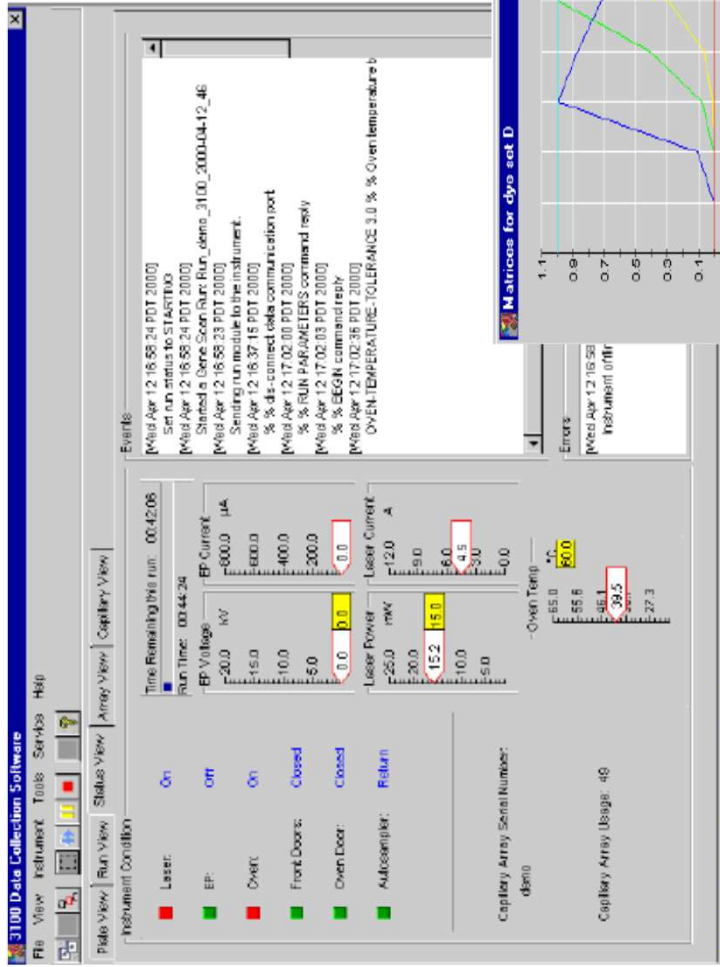


Princip fragmentační analýzy kapilární elektroforézou FA-CE

- Nezajímá nás sekvence fragmentů
- Důležité – počet bazí (délka fragmentů), množství DNA (určuje výška píku)
- Relativní size-ovací metoda – potřeba interního standardu (alignment by time scale/size scale)
- Víceru píků+artefakty – nutno odlišit konkrétní alelu
- 1 vs. vícero markerů – počet rozhoduje
- Amplifikace polymorfního místa PCR (možnost multiplex) – důležitá kvalita a kvantita templátu (empirické stanovení)
- Značení fragmentů pomocí značeného primeru (5' modifikace fluoroforem)
- Separace amplifikovaných fragmentů v elektrickém poli kapilární gelovou elektroforézou

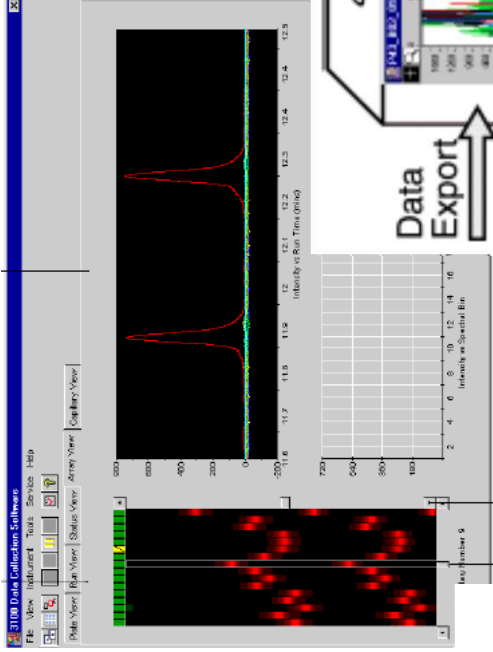
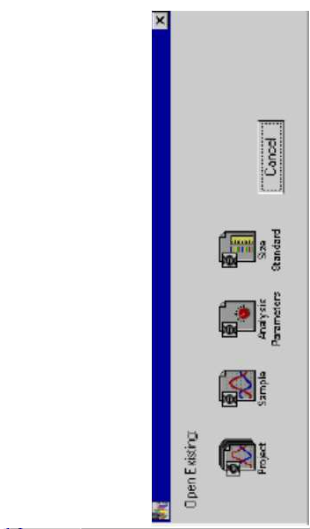
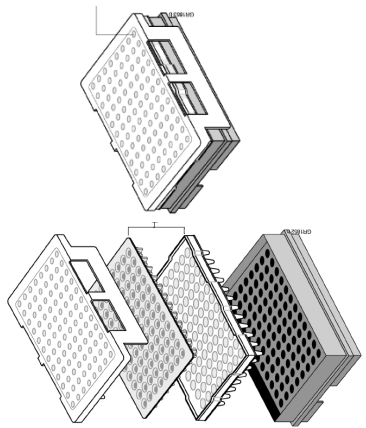
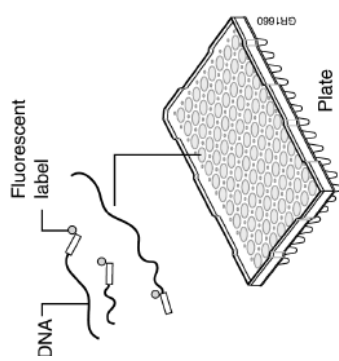
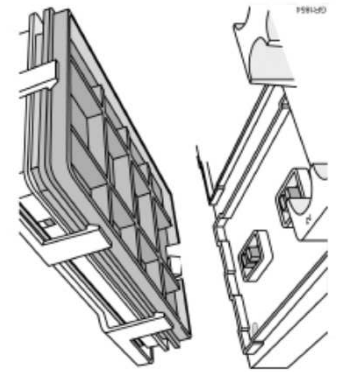
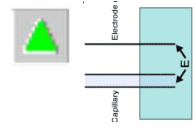
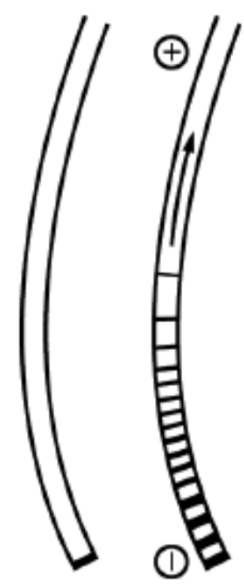
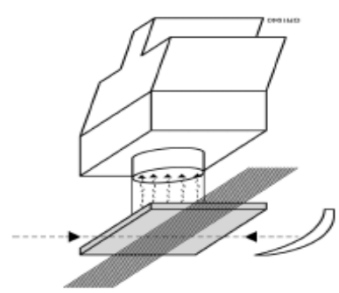


- Příprava vzorku pro FA – denaturační činidlo (formamid)+interní standard velikosti fragmentů
- Sekvenátor
- Kapilára – 36 cm, polymer POP4, matrice a spektrální kalibrace pro daný modul FA
- Ovládání softwarem – DataCollection
- Elektrokinetická injektáž – objem vzorku zůstává nezměněn
- Pohyb fragmentů DNA gelem
- Definování správných podmínek runu (modul) – bere v úvahu směs použitých fluorochromů, délku kapiláry
- Detekce emise fluoroforu při přechodu detekčním okénkem
- Převod dat – spektra – raw data – elektroforetogram
- Vyhodnocení a analýza – GeneScan + Genotyper, GeneMapper+PeakScanner

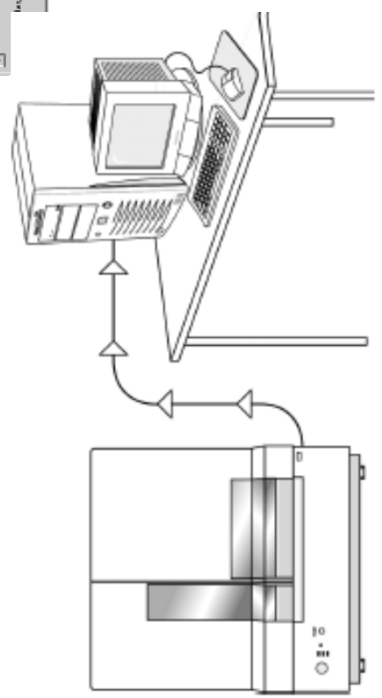
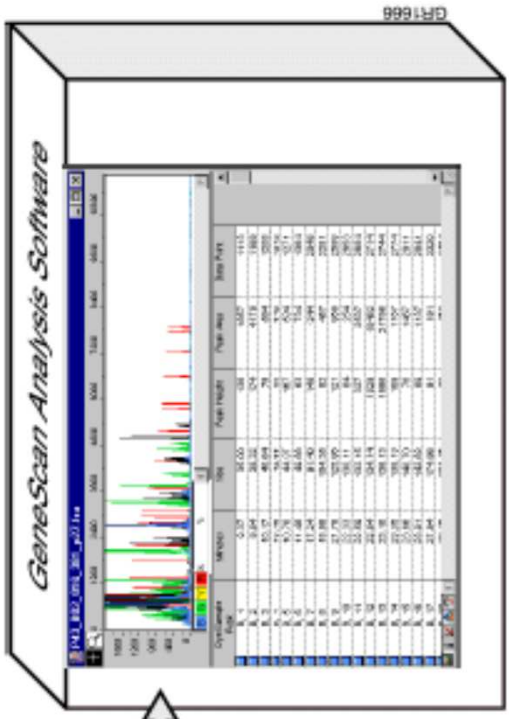


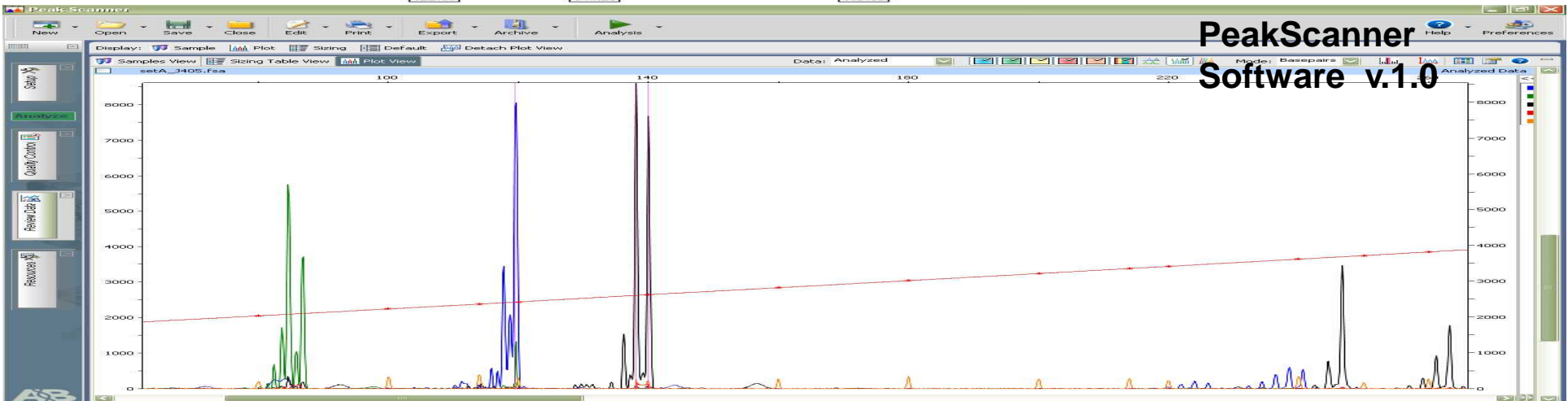
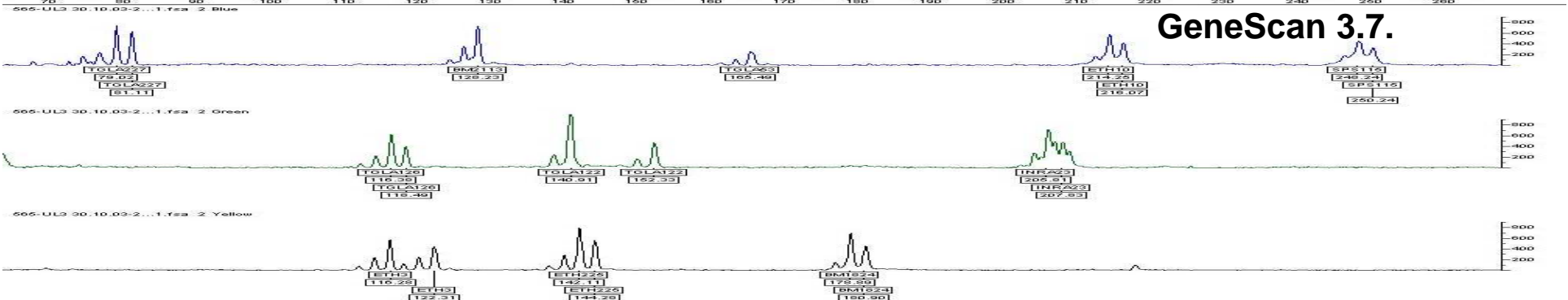
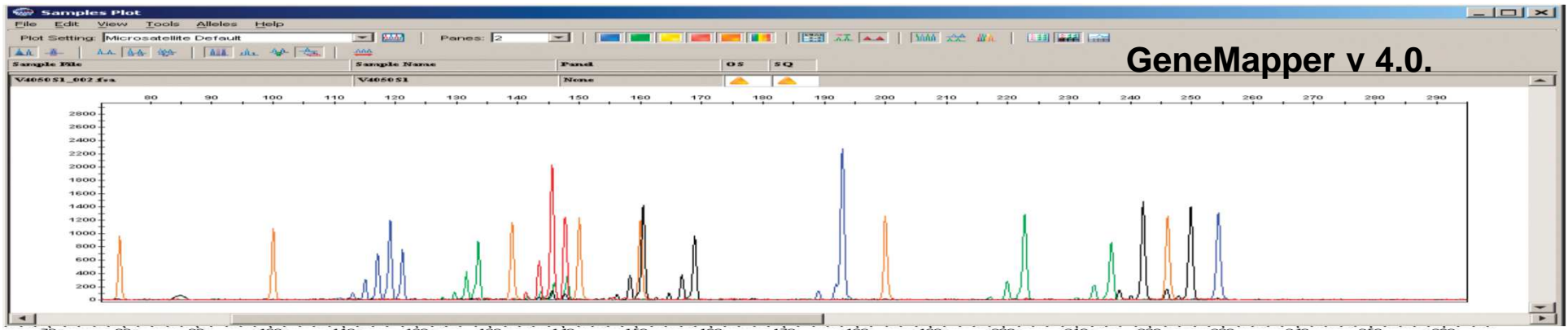
Dye Sets, Dye Chemistry, and Applications:

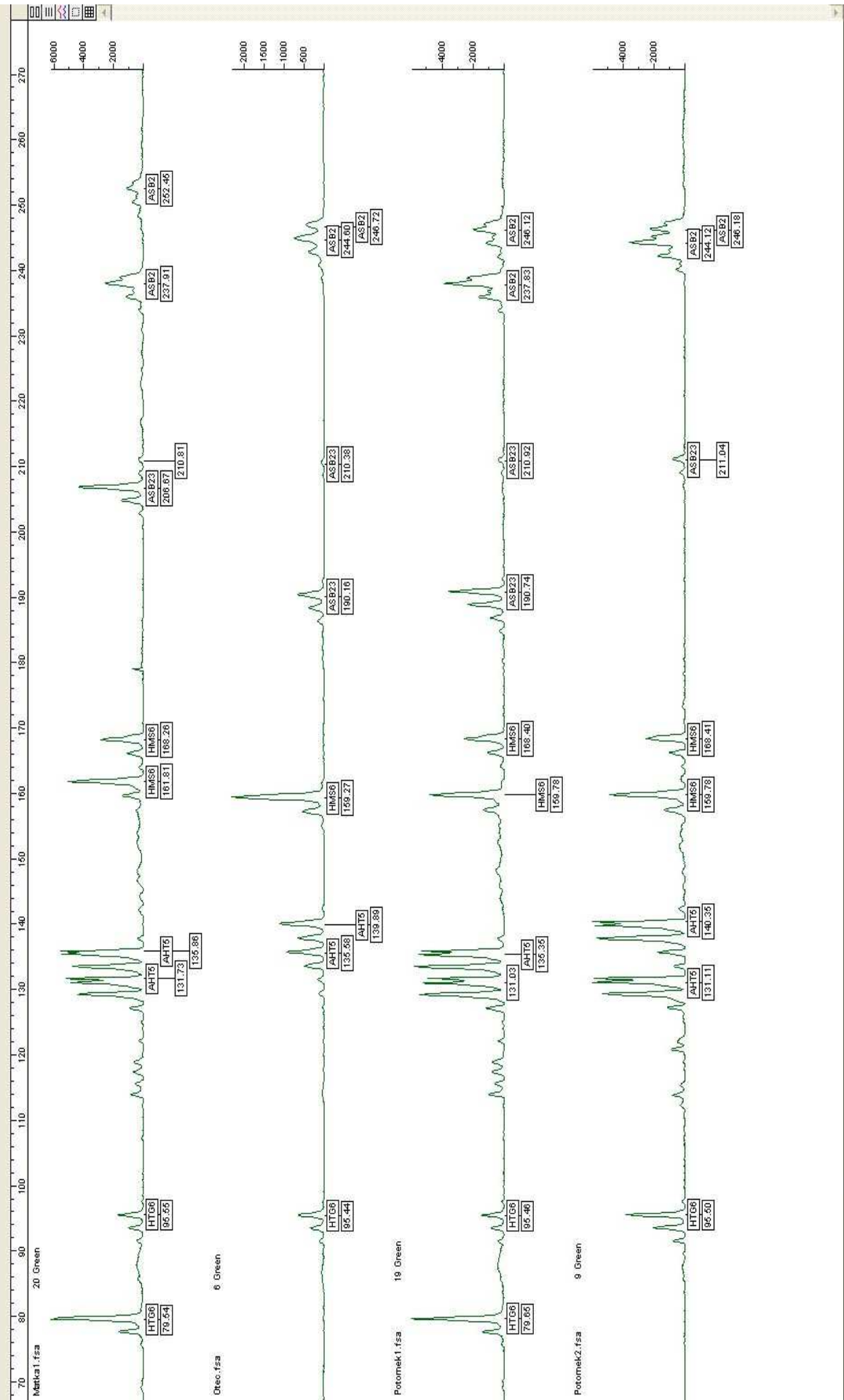
Dye Set	Dye Chemistry	Application Kit
DS-30 (D)	6-FAM™ (blue), HEX™ (green), NED™ (yellow), ROX™ (red)	<ul style="list-style-type: none"> Linkage Mapping Sets-LD20, -MD10, and -HD5 Custom Oligos
DS-31 (D)	New 4-Dye Chemistry: 6-FAM (blue), VIC™ (green), NED (yellow), ROX (red)	<ul style="list-style-type: none"> Linkage Mapping Custom Oligos Mouse Mapping Markers Custom Oligos
DS-32 (F)	5-FAM™, JOE™, NED, ROX	<ul style="list-style-type: none"> AmpFSTR® products Stockmarks™
DS-33 (G5)	6-FAM, VIC, NED, PET™, LIZ™	<ul style="list-style-type: none"> AmpFSTR® Identifier™ Custom Oligos
DS-42 (E5)	dR110, dR6G, dTAMRA™, dROX™, LIZ	SNAPshot™ Multiplex Kit



Data Export







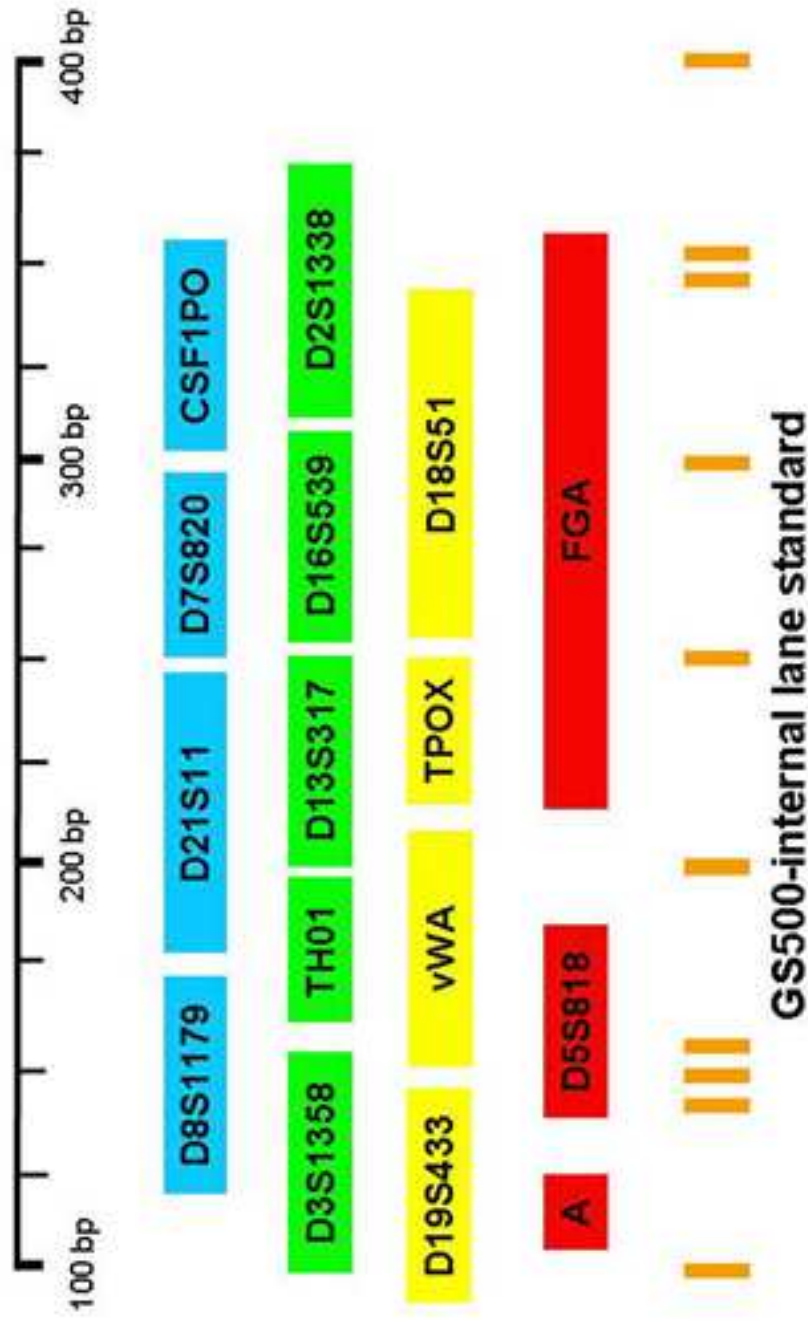
Kritéria pro tvorbu panelů MS markerů

- Počet je rozhodující
- Pokrytí celého genomu (téměř všechny chromosomy)
- Co největší variabilita, množství alel
- Vysoký PIC (polymorfní informační obsah)
- Minimum nulových alel
- Vhodnost pro multiplex-PCR
- Velikostní rozpětí fragmentů alel, vliv na použití fluorochromu na značení
- 6-FAM, NED, PET, ROX, HEX, VIC, JOE, LIZ – možnosti 4 a 5 dye systémů

Typy MS panelů

- Člověk
- Skot, Prase, Kůň
- Psi (10), dravci – sokol (tmavý, raroh, lovecký, stěhovavý), poštolka, orel (5), jelen, kočka
- Ryby (různé rody i druhy)
- Bezobratlí – šneci, blešivci, mravenci, mouchy etc...malé panely

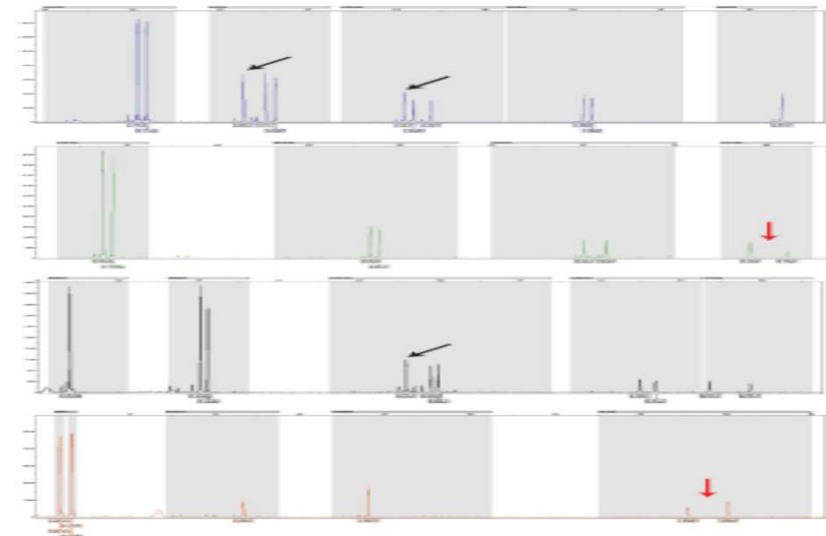
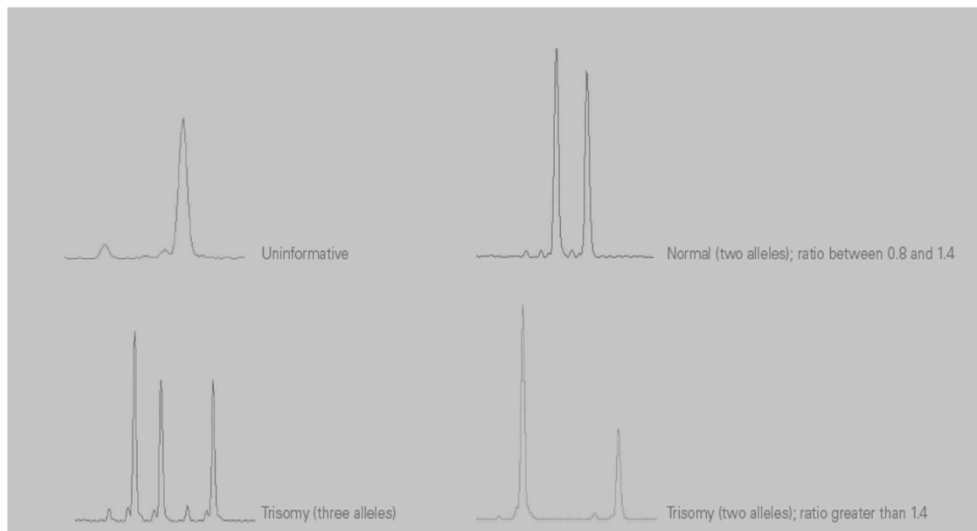
AmpFSTR® Identifier™



lokus	chromozom	fluorescenční značka	barva	rozsah (v bp)
VHL20	30	FAM	modrá	83-102
HTG4	9	FAM	modrá	116-137
AHT4	24	FAM	modrá	140-166
HMS7	1	FAM	modrá	167-187
HTG6	15	VIC	zelená	74-103
AHT5	6	VIC	zelená	126-147
HMS6	4	VIC	zelená	154-170
ASB23	3	VIC	zelená	176-212
ASB2	15	VIC	zelená	237-268
HTG10	21	NED	žlutá	83-110
HTG7	4	NED	žlutá	114-128
HMS3	9	NED	žlutá	146-170
HMS2	10	NED	žlutá	215-236
ASB17	2	PET	červená	104-116
LEX3	X	PET	červená	137-160
HMS1	15	PET	červená	166-178
CA425	28	PET	červená	224-247

Možnost stanovit množství DNA pomocí FA

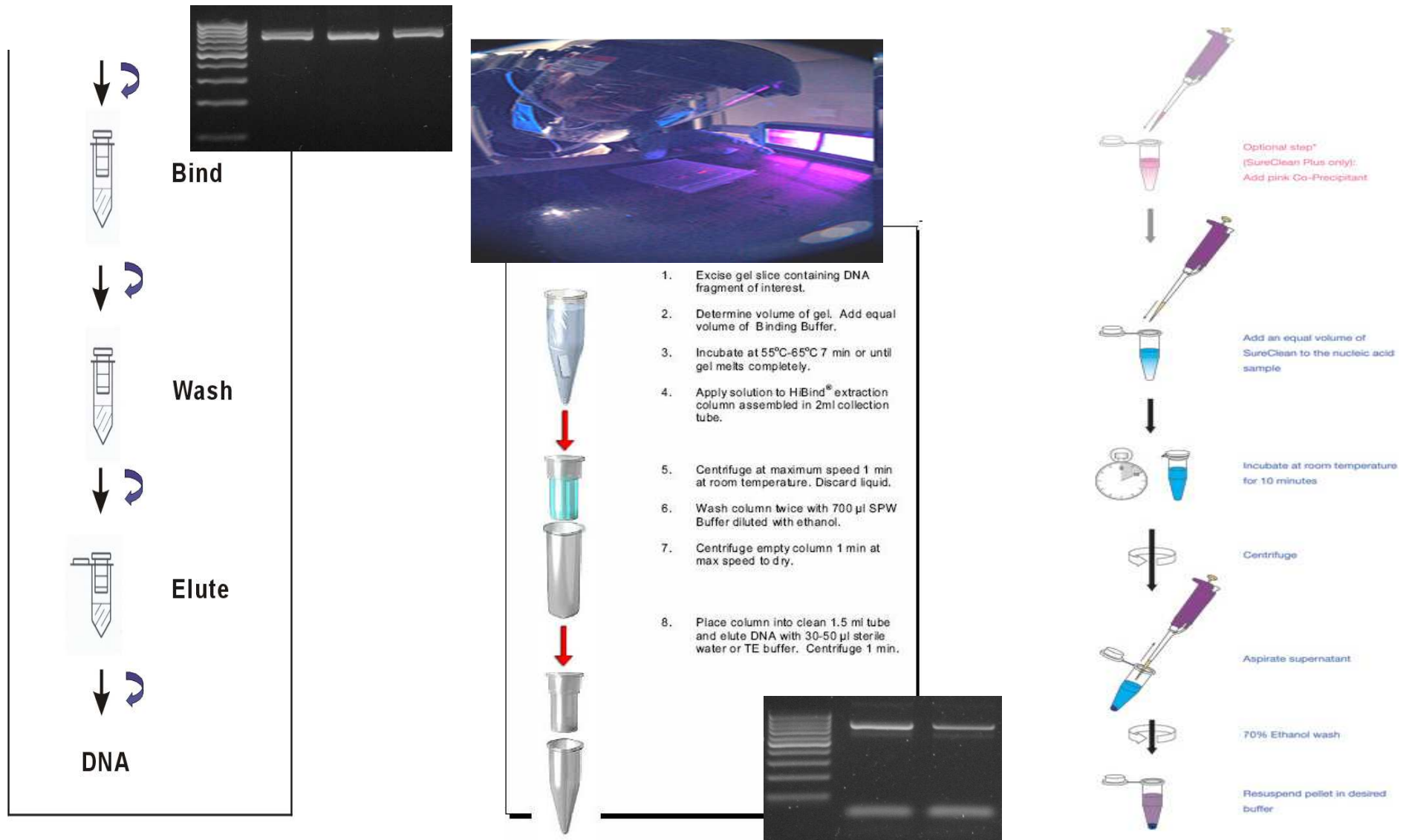
- Nezaměňovat s kvantifikací pomocí qPCR
- Určení množství ampliconu pomocí výšky a plochy píku
- Nepřesné a relativní – hrozí „plato efekt“ (vyčerpání systému)
- Využívané při detekci onemocnění způsobenými polyploidii
- Trisomie chromosomu 21 u lidí – Downův syndrom



Sekvenační reakce - příprava

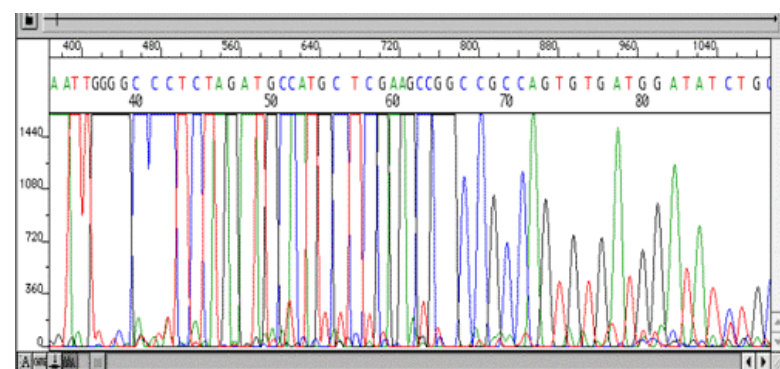
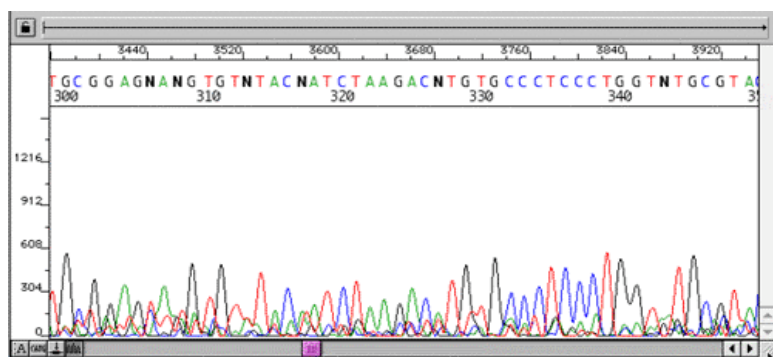
- Templát – PCR, BAC, plazmidový vektor,
- Možnosti přečištění PCR
 - Kolony
 - Purifikace fragmentu z gelu – nespecifity nebo dimery primerů
 - SureClean
- Možnosti stanovení koncentrace PCR produktu po purifikaci
 - Spektrofotometricky
 - Gelová elektroforéza – porovnání velikosti a koncentrace s markerem
 - Na základě fluorescence – Qubit
 - Nanodrop – kvalita i kvantita (koncentrace DNA při 260 nm, do up to 3700 ng/ul bez ředění)
- Reagence sekvenační PCR
 - Typy sekvenačních kitů
 - Tabulka využití
- Teplotní profil reakce – klasický vs. fast

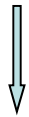
Přečištění PCR produktu



Stanovení koncentrace

Template	Cycle Sequencing Chemistry				
	BigDye Terminator v1.1 and v3.1	BigDye XTerminator Purification Kit	dGTP BigDye Terminator v3.0	dRhodamine Terminator	BigDye Primer
PCR product:					
100 to 200 bp	1 to 3 ng	0.5 to 3 ng	1 to 3 ng	1 to 3 ng	2 to 5 ng
200 to 500 bp	3 to 10 ng	1 to 10 ng	3 to 10 ng	3 to 10 ng	5 to 10 ng
500 to 1000 bp	5 to 20 ng	2 to 20 ng	5 to 20 ng	5 to 20 ng	10 to 20 ng
1000 to 2000 bp	10 to 40 ng	5 to 40 ng	10 to 40 ng	10 to 40 ng	20 to 50 ng
>2000 bp	40 to 100 ng	10 to 50 ng	40 to 100 ng	40 to 100 ng	50 to 150 ng
Bisulfite converted genomic DNA-PCR product	3 to 10 ng	3 to 10 ng	not recommended	not recommended	not recommended
Single-stranded DNA	50 to 100 ng	10 to 50 ng	50 to 100 ng	50 to 100 ng	150 to 400 ng
Double-stranded DNA	200 to 500 ng	50 to 300 ng	200 to 500 ng	200 to 500 ng	200 to 800 ng
Cosmid, BAC	0.5 to 1.0 µg	200 to 1,000 ng	0.5 to 1.0 µg	not recommended	0.5 to 1.0 µg
Bacterial genomic DNA	2 to 3 µg	1,000 to 3,000 ng	2 to 3 µg	not recommended	not recommended





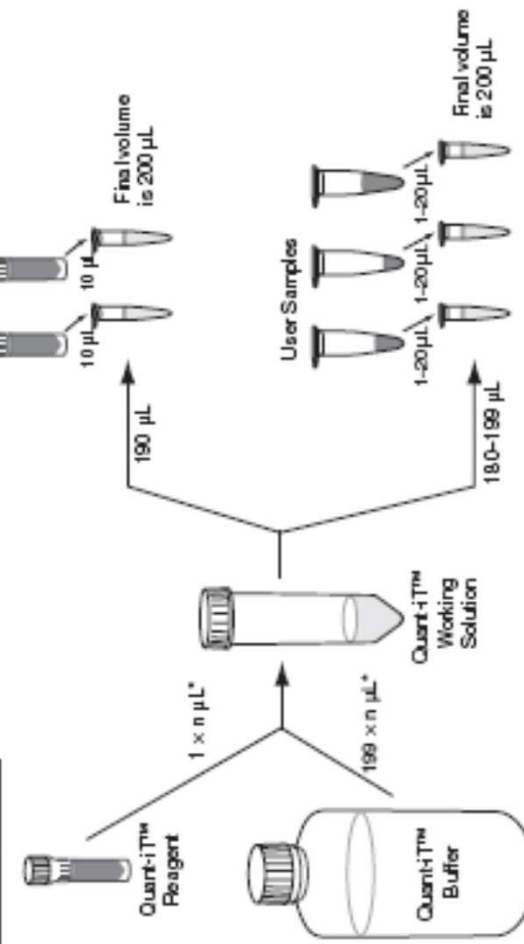
marker (v μ l)

PCR 20 10 5 2,5 1,25 0,625



fragmenty	množství DNA v ng na gelu při nanášení ředěného markeru:						
	20 μ l	10 μ l	5 μ l	2,5 μ l	1,25 μ l	0,625 μ l	0,312 μ l
1031	206	103	51,5	25,75	12,875	6,4375	3,2136
900	180	90	45	22,5	11,25	5,625	2,808
800	160	80	40	20	10	5	2,496
700	140	70	35	17,5	8,75	4,375	2,184
600	120	60	30	15	7,5	3,75	1,872
500	200	100	50	25	12,5	6,25	3,12
400	80	40	20	10	5	2,5	1,248
300	60	30	15	7,5	3,75	1,875	0,936
250	50	25	12,5	6,25	3,125	1,5625	0,78
200	80	40	20	10	5	2,5	1,248
150	30	15	7,5	3,75	1,875	0,9375	0,468
100	60	30	15	7,5	3,75	1,875	0,936
50	40	20	10	5	2,5	1,25	0,624

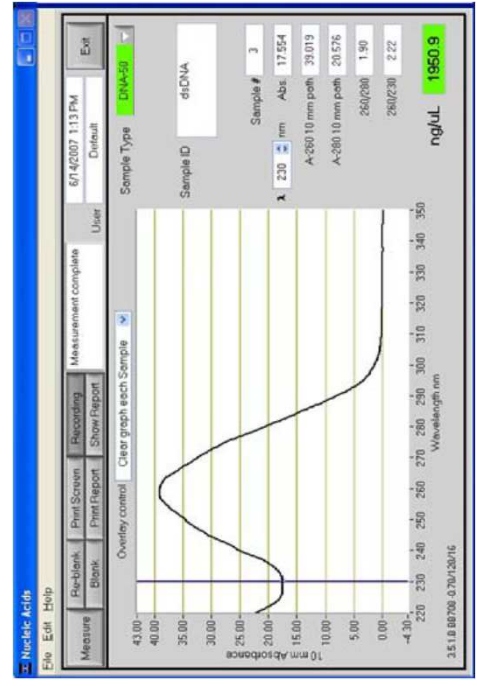
Ensure all reagents are at room temperature



* where n = number of Standards plus number of Samples



Read tubes in QubitTM fluorometer



Reagents sekvenační PCR a možnosti modifikace teplotního profilu

Chemistry Options

Applications	BigDye® Terminator v3.1 Kit	BigDye® Terminator v1.1 Kit
<i>de novo</i> sequencing	+	✓
Resequencing	+	✓
Sequencing difficult templates	+	+
Long-read sequencing	+	✓
Sequencing across all template types (plasmids, PCR products, BACs, and fosmids)	+	✓
Mixed-base detection	+	✓
Sequencing short PCR products using rapid electrophoresis run modules	✓	+

+ Recommended ✓ Satisfactory

Nové sekvenační kity

BigDye Direct Cycle Sequencing Kit

M13-tailed PCR primery

Výhody vs. nevýhody

Application	BigDye Terminator v3.1	BigDye Terminator v1.1	dGTP BigDye Terminator	dRhodamine Terminator	BigDye Primer
DNA Sequencing Application					
Bisulfite sequencing	+	++	-	-	-
Comparative sequencing (germline mutations 50:50 heterozygotes)	++	++	-	+	++
Comparative sequencing (somatic mutations 10:90 heterozygotes)	-	-	-	-	+
Comparative sequencing (somatic mutations 30:70 heterozygotes)	+	+	-	-	++
<i>De novo</i> sequencing	++	++	+	+	+
Gap closure (custom primers)	++	++	++ [‡]	+	-
Gene walking (custom primers)	++	++	+	+	-
Shotgun sequencing (universal primers, M13)	++	++	+	+	++
DNA Sequence Context					
AT-rich >65%	++	++	-	++	++
GC-rich >65%	++	++	+	+	+
GT-rich regions	+	+	++	++	++
Homopolymer A or T >25 bp [§]	-	-	-	++	-
Template Type					
BAC, cosmid, fosmid, lambda, large PCR product	++	++	-	+	+
Bacterial genomic DNA	++	++	-	-	-
Bisulfite-treated genomic DNA	+	++	-	-	-
PCR amplicon	++	++	+	++	++
PCR amplicon (heterozygous 10:90)	-	-	-	-	+



Traditional Method 690 min (11 hr 30 min)



Fast Method 245 min (4 hr 5 min)

Activation of Enzyme	PCR			PCR Final (Step)	
	Hold	Denature	Annealing	Extension	Hold
95°C	96°C	Primer T _M *	68°C	72°C	4°C
10 Min	3 sec	3 sec	See Table Below	10 sec	∞

Denaturation	Cycle Sequencing		
	Hold	Denature	Annealing
96°C	96°C	50°C	60°C
1 Min	10 sec	3 sec	75 sec
			4°C
			∞

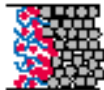
Recommended Extension Times:

Length (Kb)	Extension Time
0.5	5 sec
1.0	15 sec
1.5	30 sec

Možnosti přečištění sekvenační reakce a příprava vzorku k analýze





- Ethanol (inhibitor)
- Kombinace kolony a ethanol – odstraní víc neinkorporovaných terminátorů
- BigDye X-Terminator Kit
 - Není potřeba pracovat s formamidem (teratogen)
 - když zkrátíme dobu třepání, neubere tolik krátkých fragmentů
 - Platíčkové verze – minimum pipetování

Start

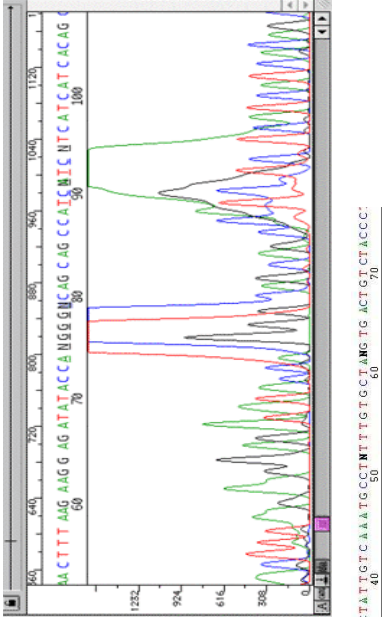
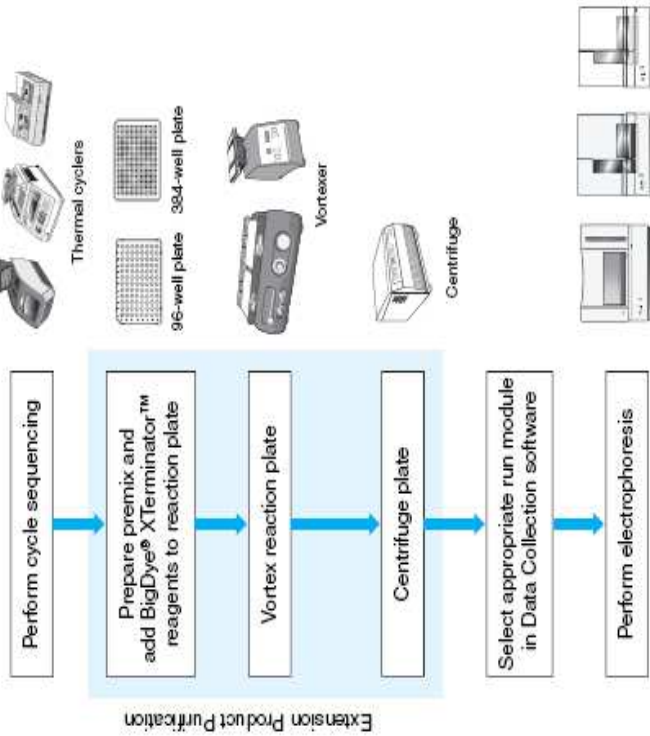


Separation

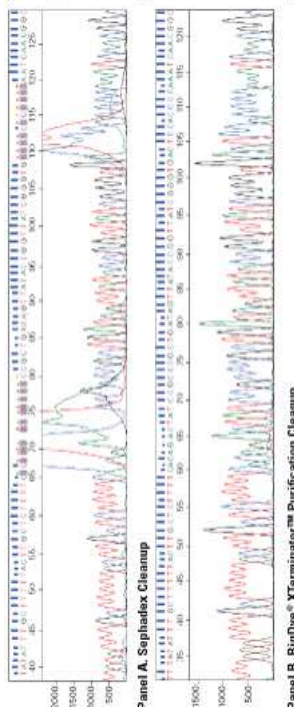
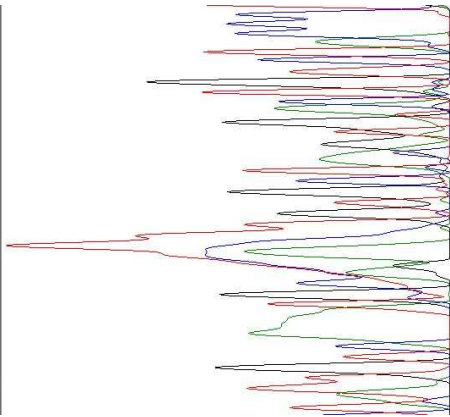


-  Gel-filtration material
-  Dye terminator
-  DNA
-  Dye terminator inside gel-filtration material

**BigDye®
XTerminator™
Purification Kit
Workflow**



:TATGTCAAATGCCCTTTTGGCTANG TG ACTGTCTACCC: 40 50 60 70



Příprava stroje před runem – běžný uživatel

