ISAGREED

Genomika hospodářských zvířat/Ukázka sekvenování

Přednáška

Modul no. 1: Genetika živočichů

Aleš Knoll

Mendelova univerzita v Brně, Agronomická fakulta

Erasmus+ project 2021-1-SK01-KA220-HED-000032068

ISAGREED

Co-funded by the European Union

Sekvenování DNA

= *stanovení sekvence DNA*

a) chemická metoda (dříve)

b) ddNTP metoda, cyklická reakce (asymetrická PCR), dnes převažuje, též Sangerovo sekvenování (tzv. 1. generace)

c) pyrosekvenování

d) sekvenování pomocí hybridizace

e) NGS - sekvenování nové generace, moderní velkoformátové aplikace , paralelní sekvenování fragmentů(2. generace)

f) sekvenování jednotlivé molekuly (3. generace)

- přesná identifikace polymorfního místa
- automatické sekvenátory (i přímá detekce polymorfizmů)

ISAGREED

Erasmus+ project 2021-1-SK01-KA220-HED-000032068

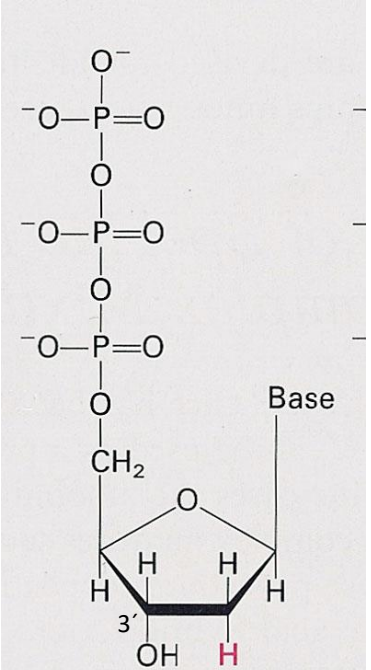
Co-funded by the European Union

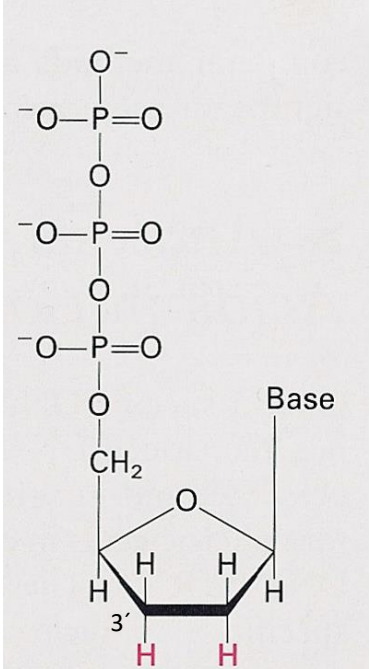
Sangerovo sekvenování

koncové terminátory: dideoxyribonukleozidtrifosfáty (ddNTP)

podle báze jsou značené 4 fluorescenčními barvami

Frederick Sanger





standardní nukleotid (dNTP) umožňuje navázaní dalšího nukleotidu na 3´konec

modifikovaný nukleotid (ddNTP) po navázání ukončuje syntézu řetězce

Erasmus+ project 2021-1-SK01-KA220-HED-000032068

Co-funded by the European Union

Přehled sekvenace

1. Příprava vzorku: obvykle PCR produkt
    - 1.1. Čištění vzorku
    - 1.2. Stanovení koncentrace DNA templátu

2. Sekvenační reakce - cyklická
    - sekvenační primer (pouze 1)!
    - polymeráza
    - pufr (+Mg^{2+})
    - dNTP
    - značené ddNTP

3. Přečištění sekvenační směsi – odstranění volných ddNTP

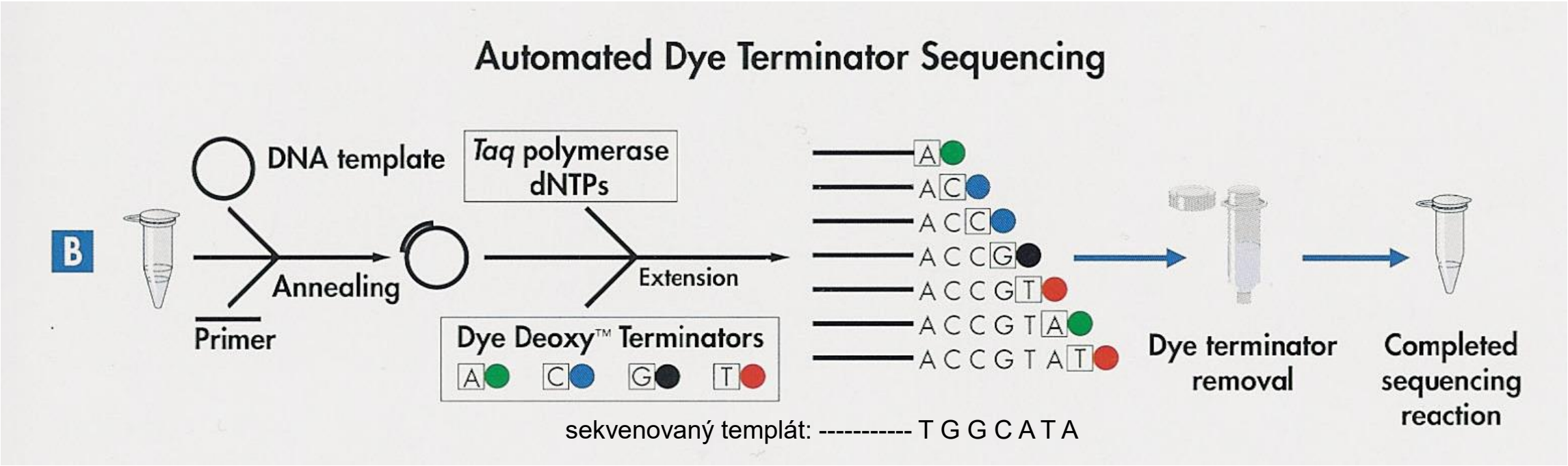
4. Elektroforéza (kapilární) na sekvenátoru

5. (Automatické) vyhodnocení - určení sekvence

Erasmus+ project 2021-1-SK01-KA220-HED-000032068

Co-funded by the European Union

Čtyřbarevné terminátorové sekvenování



značené terminátory, vše probíhá v 1 reakci, včetně elektroforézy. Současná varianta.

sekvenovaný templát: ---------- T G G C A T A

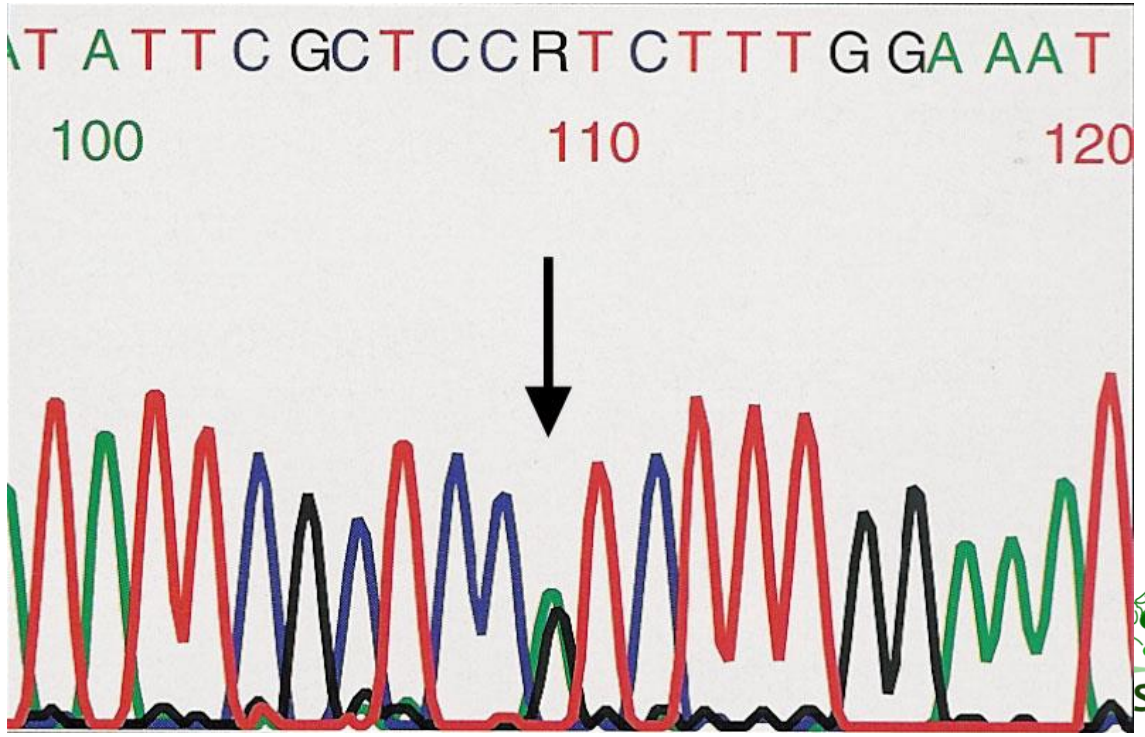
Co-funded by the European Union

Sekvenátor

Kapilární elektroforézou se rozdělí různě dlouhé jednořetězce podle velikosti a odečte se příslušná fluorescenční barva, která indikuje bázi přítomnou v daném místě DNA.

např. syntetizovaný řetězec dlouhý 100 nukleotidů svítí zeleně,

tj. v pozici 100 templátu byl adenin



Co-funded by the European Union

Výhody a nevýhody Sangerova sekvenování

- dlouhé čtení (až 800 bp)
- vysoká přesnost, spolehlivost
- nízká celková cena
- malý výkon, vysoká cena vzhledem k počtu osekvenovaných bází
- vhodné pro sekvenování jednotlivých genů a detekci mutací ve známých sekvencích

Erasmus+ project 2021-1-SK01-KA220-HED-000032068

Co-funded by the European Union

Sekvenátory nové generace

tzv. „New Generation Sequencing“, NGS

2. generace sekvenování

- tzv. celogenomové sekvenování
- sekvenují po malých kouscích, ale v obrovském množství těchto fragmentů současně

tzn. princip masivního paralelního sekvenování

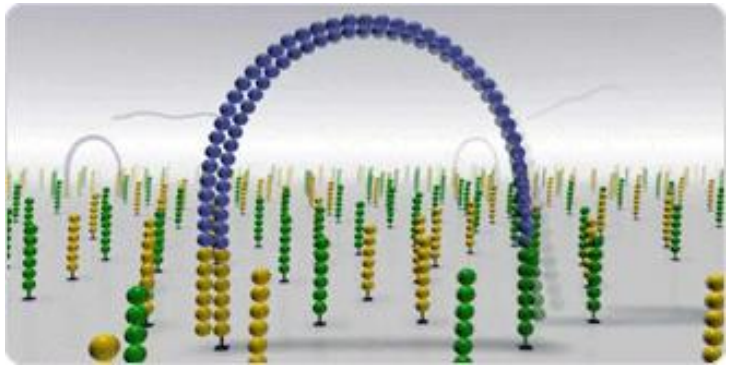
- umožňuje vysokou kapacitu sekvenátorů a výrazné snížení ceny za osekvenovanou bázi

- např. Illumina; Life Technologies SOLiD 3 a další

Erasmus+ project 2021-1-SK01-KA220-HED-000032068

Co-funded by the European Union

NGS Illumina



*sequencing by synthesis

Illumina: NovSeq : cca 8 TB

NextSeq: až 120 GB (dříve HiSeq 600GB)

MiSeq: až 15 GB

MiniSeq: 7,5 GB

Princip: bridge PCR (můstek), 4fluorescenční sekvenace SBS*, po cca 150 až 300 bp,

vlastní sekvenace v klastrech stejné sekvence – barevně svítí příslušný spot podle NTP.

NextSeq

MiSeq

Co-funded by the European Union

NGS - shrnutí

- velikost genomů savců se pohybuje okolo 3 mld bp
- pokrývá celou genetickou informaci jedince
- umožňuje nalézt nové nebo identifikovat stávající polymorfizmy a mutace
- problémem je velké množství dat a jejich interpretace
- výsledky uloženy v genomových databázích (ncbi aj.)
- možnost individuálního sekvenování (personální genomika)

Erasmus+ project 2021-1-SK01-KA220-HED-000032068

ISAGREED
Co-funded by the European Union

Sekvenování 3. generace

Single Molecule Technologies

- sekvenování jednotlivé molekuly
- nejsou chyby vlivem amplifikace
- dlouhá čtení (de novo sekvenování) – až 7kb!!! (3,5-8)
- malé množství templátu
- zatím ale vysoká chybovost čtení (proto se musí číst sekvence opakovaně)

př.

SMRT – Single Molecule Real Time Sequencing (fa. Pacific Bioscience)

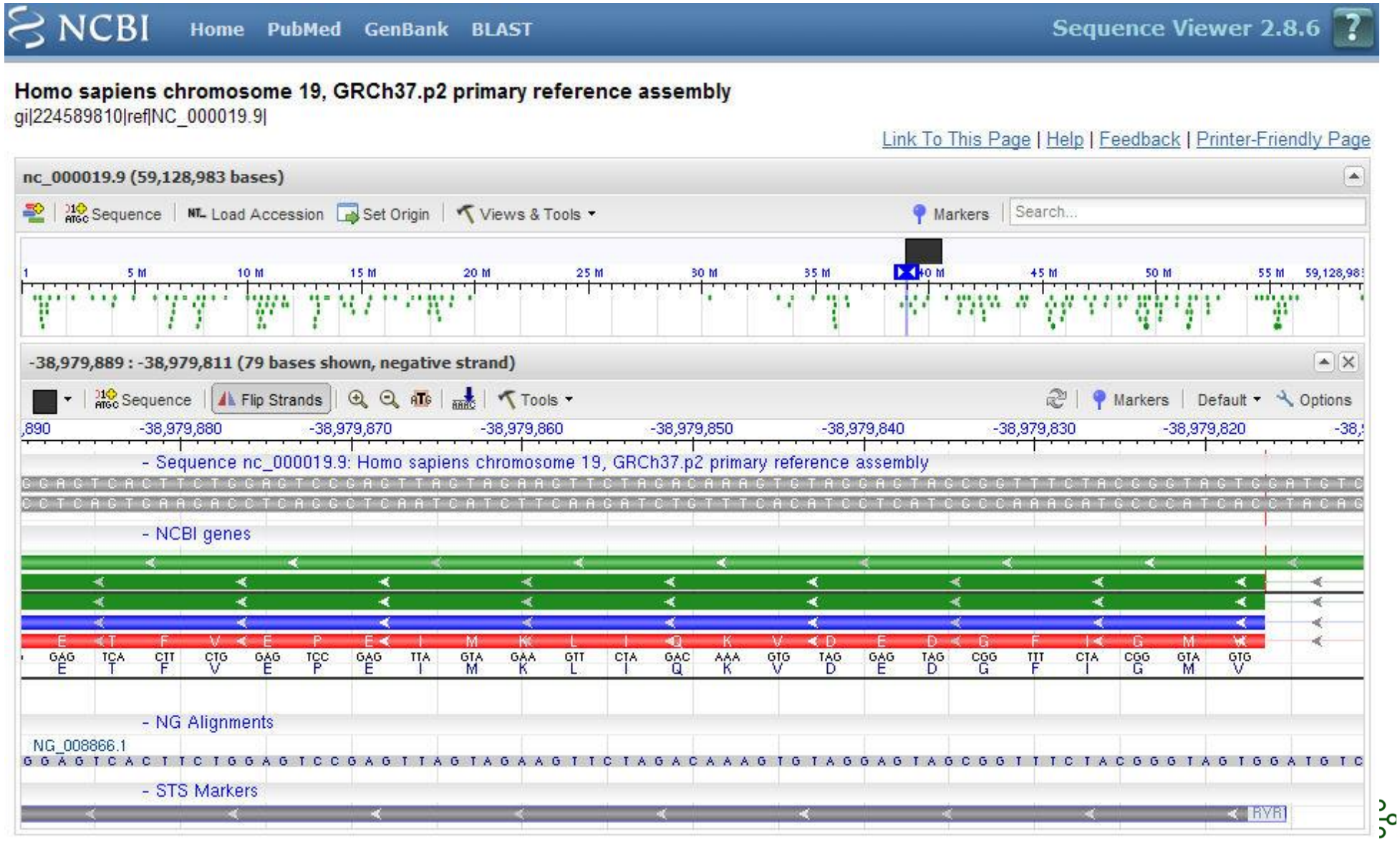
Nanopórové technologie (Oxford Nanopore)

Erasmus+ project 2021-1-SK01-KA220-HED-000032068

Co-funded by the European Union

Fyzická mapa ze sekvenování genomu

internetová databáze NCBI umožňuje prohlížení až na úroveň sekvence jednotlivých nukleotidů genu



ISAGREED

Co-funded by the European Union

Druhová identifikace s využitím sekvenování

Molekulární taxonomie, **DNA barcoding**

umožňuje identifikovat druh, kde to nelze klasickou metodou, např. u larvy hmyzu

a) mtDNA (COI)

b) jaderné geny

Sekvenování specifického fragmentu, srovnání v databází Bold nebo Blast.

Výhodou mtDNA je více kopií, tzn. větší množství DNA na množství biol. materiálu a vyšší stabilita. Nevýhodou možnost kontaminace bakteriálním genomem (Wolbachia atp.).

Erasmus+ project 2021-1-SK01-KA220-HED-000032068

Co-funded by the European Union

DNA barcoding

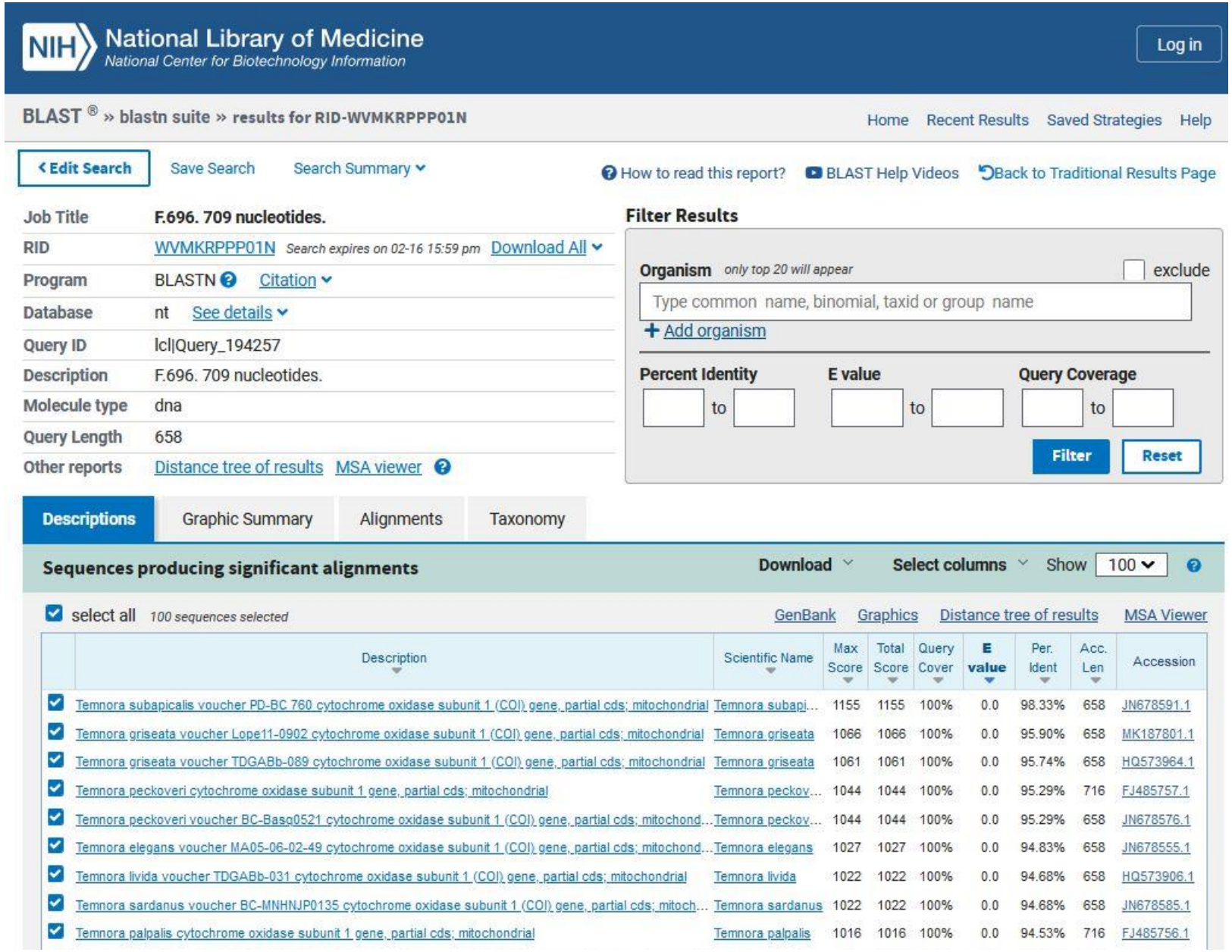
Bar sekvenace mtDNA muzejního vzorku motýla:

```
>F.696.  709 nucleotides.
AACATTATATTTTATTTTTGGAATTTGAGCAGGTATAGTAGGAACTTCATTAAGA
TTACTAATTCGAGCGGAATTAGGAACCCCAGGATCTTTAATTGGAGATGATCAAATTTATAATACAATTGTAACAGCCCA
TGCATTTATTATAATTTTTTTCATAGTAATACCTATTATAATTGGAGGATTTGGAAATTGATTAGTCCCTTTAATGTTAG
GAGCCCCTGATATAGCATTCCCACGAATAAATAATATAAGATTTTGACTTTTACCACCATCTTTAACTCTTTTAATTTCC
AGAAGTATCGTAGAAAATGGAGCAGGAACAGGATGAACAGTTTATCCCCCCCTATCTTCTAACATTGCCCATAGAGGTAG
TTCAGTAGATCTTGCAATTTTTTCTTTACATTTAGCTGGAATTTCATCTATTATAGGAGCAGTTAATTTTATTACCACAA
TTATTAATATACGAATTAATAATATATCATTCGATCAAATACCATTATTTATTTGAGCTGTGGGAATTACAGCATTTTTA
TTACTTTTATCTTTGCCAGTATTAGCTGGAGCTATTACTATACTTTTAACCGATCGTAATCTTAATACATCATTTTTTGA
TCCAGCTGGAGGAGGTGATCCTATTTTATACCAACATTTATTT
```

Erasmus+ project 2021-1-SK01-KA220-HED-000032068

Co-funded by the European Union

Identifikace druhu (Blast)



nucleotide Blast:
https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

nejvyšší homologie:

= *Temnora subapicalis*

ISAGREED

Co-funded by the European Union

ISAGREED

Partners:

Mendel University in Brno

Siedlce University of Natural Sciences and Humanities

Czech University of Life Sciences Prague

Děkuji za vaši pozornost!

*This presentation has been supported by the Erasmus+ KA2 Cooperation Partnerships grant no. **2021-1-SK01-KA220-HED-000032068 "Innovation of the structure and content of study programs in the field of animal genetic and food resources management with the use of digitalisation - Inovácia obsahu a štruktúry študijných programov v oblasti manažmentu živočíšnych genetických a potravinových zdrojov s využitím digitalizácie"**. The European Commission support for the production of this presentation does not constitute an endorsement of the contents which reflects the views only of the authors, and the Commission cannot be held responsible for any use which may be made of the information contained therein.*

Aleš Knoll

knoll@mendelu.cz

ISAGREED

Co-funded by the European Union