

Téma 4: Genomika hospodářských zvířat/Ukázka sekvenování

Přednáška

V této přednášce se budeme zabývat genomikou u hospodářských zvířat a především sekvenováním. Přednáška je součástí modulu 1, genetika zvířat. Vytvoření této prezentace bylo podpořeno grantem ERASMUS + KA2 v rámci projektu ISAGREED, Inovace obsahu a struktury studijních programů v oblasti managementu živočišných genetických a potravinových zdrojů s využitím digitalizace.

Sekvenování DNA

Sekvenování DNA je základní molekulárně-genetická metoda. Metoda umožňuje přečíst genetickou informaci, která je uložena formou sekvence (pořadí) nukleotidů v molekule DNA. Na tomto obrázku uvádím přehled nejvýznamnějších sekvenačních metod od nejstarší po nejmodernější. Chemická metoda založená na specifickém štěpení řetězce DNA a označovaná podle objevitelů jako Maxamova-Gilbertova byla první sekvenační metodou, nicméně dnes se již nepoužívá. Dodnes se využívá metoda objevená Frederikem Sangerem, po němž nese pojmenování. Označuje se též jako dideoxy metoda, protože využívá speciálně modifikované nukleotidy, tzv. koncové terminátory. Ty se přidávají do směsi k normálním nukleotidům a v případě jejich začlenění do řetězce se syntéza ukončuje. Pyrosekvenování a sekvenování pomocí hybridizace jsou alternativní metody, jejichž využití v současnosti malé. Naopak sekvenování nové generace (NGS) je velmi rozšířené a využíváno z důvodu vysoké rychlosti a sekvenační kapacity, neboť lze využít i na sekvenaci celých genomů a je označováno jako sekvenace 2. generace. Stále více se využívá metod založených na sekvenaci jednotlivé molekuly DNA označované jako sekvenování 3. generace.

Velkou výhodou sekvenování je to, že umožňuje jednoduchou a přesnou identifikaci polymorfního místa, respektive mutace. Moderní automatické sekvenátory jsou vhodné i pro přímou detekci polymorfizmů.

Sangerovo sekvenování

Princip metody objevil v roce 1977 anglický biochemik Frederick Sanger. Základem Sangerova sekvenování jsou dideoxynukleotidy, označované ddNTP neboli koncové terminátory. Jedná se o modifikovaný nukleotid, který má odstraněnou vazebnou skupinu OH na 3. uhlíku deoxyribózy, která je nutná pro navázání dalšího nukleotidu. Po začlenění ddNTP se tak **syntéza**

řetězce zastaví, přičemž vznikne řetězec o velikosti a barvě odpovídající příslušnému nukleotidu na templátu.

Přehled sekvenování

Proces sekvenace se skládá z několika kroků. Začíná přípravou vzorku, kterým je nejčastěji PCR produkt. Ten musí být přečištěn, aby obsahoval jen DNA templátu. Dále musíme znát její alespoň přibližnou koncentraci. Vlastní sekvenační reakce je lineární cyklická enzymatická reakce, která musí obsahovat uvedené složky. Sekvenační primer nám vymezí začátek sekvenování, musí být použit vždy jen jeden, nikoliv dva jako u PCR. Reakci katalyzuje DNA polymeráza uvnitř reakčního pufru s přidavkem standardních dNTP (podobně jako u PCR) a navíc ddNTP. Následuje přečištění sekvenační reakce, kdy se musí odstranit volné značené ddNTP. Směs fragmentů je rozdělena pomocí kapilární elektroforézy v sekvenátoru a výsledek vyhodnocen.

Čtyřbarevné terminátorové sekvenování

V současnosti se rutinně využívá varianta označovaná jako čtyřbarevné terminátorové sekvenování. Jednotlivé terminační nukleotidy jsou značeny fluorescenčními barvami podle toho, jako dusíkatou bázi nesou, resp. s jakým nukleotidem na templátu se párují. Působením polymerázy se syntetizují komplementární řetězce k templátu, přičemž většinou jsou začleněny normální dNTP a řetězec se prodlouží, nahodile se ale začleňují i ddNTP, které pak syntézu řetězce ukončí. Vzniklý fragment je označen fluorescenční barvou, která odpovídá nukleotidu na příslušné pozici templátu.

Sekvenátor

Vzniká směs jednořetězcových různě dlouhých a různě obarvených molekul. Abychom zjistili, na které pozici se vyskytuje která báze, musí proběhnout přesné elektroforetické rozdělení této směsi fragmentů. K tom se využívá fluorescenční kapilární elektroforézy, která je základem genetických analyzátorů, neboli sekvenátorů. Tento přístroj dokáže fragmenty nejen rozdělit a seřadit dle velikosti, ale přímo odečíst sekvenci nukleotidů na základě různobarevných píků. Např. syntetizovaný řetězec dlouhý 100 nukleotidů svítí zeleně, tj. v pozici 100 templátu byl adenin, řetězec dlouhý 101 svítí červeně, tzn. v pozici 101 byl thymin atp.

Výhody a nevýhody Sangerova sekvenování

Sangerova metoda je nejrozšířenější sekvenační metodou. Mezi její výhody patří čtení relativně dlouhých řetězců DNA (cca 800 bp) a zároveň vysoká přesnost a spolehlivost. Pokud

potřebujeme znát sekvenci nebo detekovat mutaci v konkrétním úseku genomu u jednoho nebo několika málo jedinců, tak se jedná o cenově nejvýhodnější variantu. Ve srovnání s metodami NGS je však výkon a cena za 1 osekvenovanou bázi velmi vysoká, metoda tedy není vhodná na sekvenování velkých úseků genomu, nebo dokonce celých genomů.

Sekvenátory nové generace

Pro sekvenování celých genomů je vhodnější použít další metodu, a to tzv. sekvenování nové generace, ve zkratce NGS. Z tohoto důvodu se metoda označuje též jako celogenomové sekvenování, nebo též sekvenování 2. generace. Metoda je založena na fragmentaci DNA a sekvenování krátkých fragmentů, ale v obrovském množství současně a označuje se tak jako masivní paralelní sekvenování. Metoda umožňuje obecně velmi vysokou kapacitu sekvenování, nicméně lze si vybrat varianty sekvenátory s kapacitou podle vlastních potřeb od 1 GB po 8 TB.

Sekvenátory nové generace

Mezi běžně rozšířené NGS sekvenátory patří přístroje firmy Illumina. Základem metody je tzv. můstková PCR a sekvenace při syntéze s využitím 4 barevné fluorescence. Vlastní sekvenace probíhá v klastrech stejné sekvence – barevně svítí příslušný spot podle báze. Sekvenují se úseky o velikosti od 150 do 300 nukleotidů. Podrobnější vysvětlení je nad časový rámec této přednášky a zájemcům o pochopení této poměrně složité metody doporučuji shlédnutí videí na internetu.

NGS shrnutí

Sekvenování nové generace je dnes velmi využívaným nástrojem v genetice pro výzkum i diagnostiku. Vysoká kapacita metody umožňuje během několika hodin až dnů získat sekvence i velkých genomů zvířat, např. savců, jejichž velikost se pohybuje kolem 3 miliard nukleotidů, což by metodou Sangerova sekvenování byla práce na několik let. Je možné takto získat celou genetickou informaci jedince. Umožňuje proto nalézt velké množství nových nebo detekovat všechny známé polymorfizmy a mutace. Vzniká ale problém se zpracováním a vyhodnocením velkého množství dat, a proto je třeba využít velmi výkonných bioinformatických nástrojů. Celogenomová data jsou uložena v genomových databázích jednotlivých organismů, lze tak provádět srovnání s konkrétním vzorkem. Metoda má význam i pro sekvenování jednotlivce, např. pacienta, čemuž se věnuje obor personální genomika.

Sekvenování 3. generace

Jako sekvenování 3. generace jsou označovány sekvenační techniky založené na sekvenování jednotlivé molekuly. Výhodou jsou dlouhá čtení, v případě de novo sekvenování až 7 kb. To umožňuje správně identifikovat varianty na jednom řetězci, tzv. haplotypy, což čtení krátkých sekvencí u 2. generace neumožňuje. Metoda je postupně zdokonalována, protože chybovost čtení je zatím ve srovnání s oběma předchozími generacemi vyšší. Dostupná je metoda označovaná jako Single molecule real time sequencing od firmy Pacific Bioscience nebo nanopórové sekvenátory firmy Oxford Nanopore.

Fyzická mapa ze sekvenování genomu

Výsledky celogenomového sekvenování jsou uloženy v genomových databázích a často volně dostupné, například internetová databáze NCBI umožňuje prohlížení až na úroveň sekvence jednotlivých nukleotidů genu.

Druhovú identifikace s využitím sekvenování

Dalším praktickým využitím sekvenování u živočichů je druhová identifikace. Molekulární taxonomie využívá tzv. DNA barcoding, který umožňuje identifikovat druh, kde to nelze klasickou metodou, např. u larvy hmyzu. Využívá se k tomuto účelu především fragmentu genu pro cytochrom C oxidázu I, který leží v mitochondriální DNA. Tento fragment je osekvenován obvykle Sangerovou metodou a druhová identifikace provedena srovnáním s určenými sekvencemi uloženými v databázích Bold nebo Blast. Výhodou mtDNA je více kopií, tzn. větší množství DNA na množství biol. materiálu a vyšší stabilita, využívá se tak i pro determinaci starších či muzejních vzorků. Nevýhodou je možnost kontaminace bakteriálním genomem (Wolbachia atp.).

DNA barcoding

Na tomto obrázku je ukázka konkrétní sekvence získané sekvenováním mtDNA starého muzejního vzorku.

Identifikace druhu (Blast)

Vložení sekvence do internetového srovnávacího nástroje Blast se podařilo druh na základě homologie identifikovat.

A nyní je přednáška je u konce. Věřím, že jste pochopili základní principy jedné z nejdůležitějších molekulárně-genetických metod - sekvenování. Doporučuji i shlédnutí navazující prezentace Laboratorní příklady. Děkuji za pozornost.