

Téma 4: Genomika hospodářských zvířat/Ukázka sekvenování

Praktický příklad

V této prezentaci se budeme zabývat základní metodou z oblasti genomiky hospodářských zvířat, a to sekvenováním. Na příkladu si ukážeme laboratorní proces Sangerova sekvenování na automatickém sekvenátoru. Prezentace 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.

Vlastní laboratorní postup Sangerova sekvenování zahrnuje několik kroků. Prvním je příprava vhodného vzorku, tzn. DNA. Jako vzorek může být použita DNA klonovaná ve vektoru a získaná izolací z bakteriálních buněk. Pro sekvenování se zde používají univerzální primery a proto je výsledek obvykle vysoce kvalitní. Ne vždy ale máme k dispozici naklonovanou DNA. Častěji jako templát používáme PCR produkt. Zde je kritická jeho čistota (PCR produkt musí být přečištěn) a také jeho množství. Pokud máme kvalitní vzorek, můžeme přistoupit k druhému kroku – vlastní sekvenační reakci. Jedná se o enzymatickou reakci podobnou PCR, nicméně musí se použít pouze jeden primer a komerčně dostupná reakční směs, která obsahuje specificky fluorescenčně značené ddNTP (každá báze jinou barvou), tzv. koncové terminátory. Výsledkem je směs fragmentů, z nichž každý je zakončen terminátorem, který svou barvou indikuje bázi v příslušném místě sekvence. Detailní popis metody můžete vyslechnout v přednášce k tomuto tématu. Následuje odstranění volných nukleotidů a přesná kapilární elektroforéza. Posledním krokem je softwarové vyhodnocení získaných dat a poskládání konečné sekvence.

Jednou z možností odstranění volných nukleotidů, především **volných** barevně značených koncových terminátorů, je použití emulze porézního činidla, které tyto nukleotidy absorbuje a roztok se tak vyčistí. Před přidáním do sekvenační směsi musí být činidlo důkladně promícháno vortexováním a následně odebráno špičkou s ušříženým koncem. Za tímto účelem je třeba nechat sekvenační směs s emulzí třepat 30 minut. Po centrifugaci se odebere supernatant do sekvenačního platu a je připraven k analýze v sekvenátoru.

Základem automatického sekvenátoru je fluorescenční kapilární elektroforéza. Na tomto obrázku jsou vidět základní komponenty přístroje – vlevo je anodová část s pumpou polymeru, uprostřed detekční komůrka, vpravo nahoře kapilární array a dole plato se vzorky a katodová část. Před každou separací pumpa natlačí čerstvý polymer do kapilár, následně je elektroinjektází nabrán vzorek do kapiláry a probíhá separace směrem od katody k anodě. Fluorescenční signál je snímán v detekční části.

Na tomto obrázku je detail s pumpou, sáček s polymerem, anoda a nádobka s anodovým pufrům.

Základem přesné separace DNA jsou skleněné kapiláry naplněné polymerem. Polymer je speciální gel se separační schopností. DNA putuje kapilárou a dělí se podle velikosti. Menší fragmenty doputují k okénku dříve, než delší a přístroj odečte příslušný signál (fluorescenční barvu).

Vložení čerstvého anodového elektroforetického pufru musí proběhnout velmi opatrně. Je vidět blok s čerpadlem, které vždy před **během přeplní** kapiláru čerstvým polymerem. Sáček vpravo obsahuje separační polymer.

Automatický podavač se vysune a je připraven na vložení plat se vzorky.

Vzorky s přečištěnou sekvenační reakcí jsou umístěny na platu (uprostřed), které se uzavře do speciálního držáku.

Nejprve vložíme kazetu s katodovým pufrem (vlevo) a promývacím roztokem (vpravo), následně připravenou desku se vzorky. Po uzavření, sekvenátor sám najede do správné pozice.

Můžeme vložit maximálně 2 plata se vzorky, tzn. celkově 192 vzorků.

Po promývacím kroku jsou elektrody ponořeny do vzorků a probíhá elektroinjektáž do kapilár, následně jsou elektrody umístěny do katodového pufru a začíná elektroforéza.

Odečet fluorescenčního signálu probíhá postupně tak, jak doputují příslušné fragmenty k čidlu

Po ukončení elektroforézy zkontrolujeme surová data.

Vyhodnocení probíhá pomocí Sequencing analysis software. Barva píku odpovídá příslušné bázi v sekvenci, která je uvedena nahoře. Zde vidíme i příklad heterozygota, pozná se tak, že na stejné pozici jsou píky dvou různých barev.

Lze využít specifického software pro srovnání sekvencí velkého množství vzorků a tím nalézt rozdíly – polymorfizmy. U uvedených vzorků včel se vyskytují 2 typy polymorfizmů – deleční vlevo a jednonukleotidový vpravo. Vyhodnocení tohoto výsledku nám umožnilo rozlišit různé haplotypy mitochondriální DNA v naší populaci včel, které souvisí s jejich původem.

Hotovou sekvenci můžeme exportovat ve vhodném formátu pro další využití.

Pro srovnávání hotových sekvencí je vhodný např. program Clustal. Můžeme tak najít mutace způsobující onemocnění, alely ovlivňující užitkové vlastnosti hospodářských zvířat, stanovit genetickou diverzitu v populaci zvířat, příbuznost a mnoho dalších užitečných aplikací.

A to je vše k této krátké prezentaci vysvětlující laboratorní postup určení sekvence genetické informace. Věřím, že názorné ukázky v tomto videu vám pomohou pochopit jednu ze základních laboratorních metod, bez kterých se moderní genetika a genomika neobejde. Děkuji za pozornost.