



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

Vzdělávání středoškolských pedagogů a studentů středních škol jako nástroj ke zvyšování kvality výuky přírodovědných předmětů

CZ.1.07/1.1.00/14.0016



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE

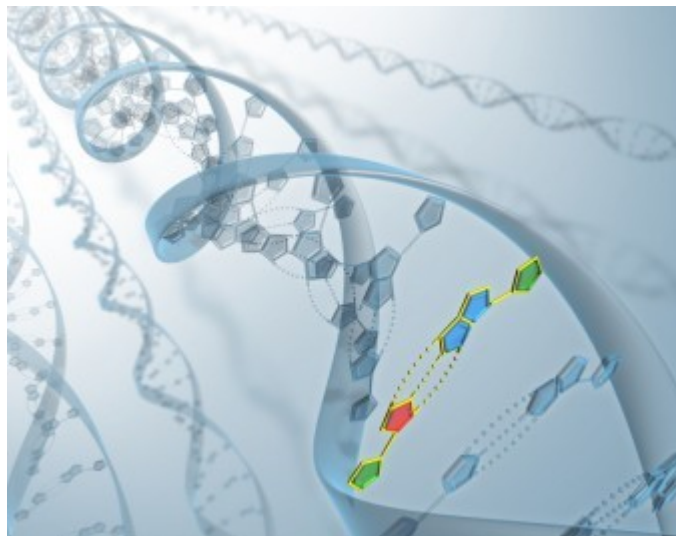


MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ



Molekulární markery využívané při studiu variability rostlin

Miloslav Kitner

Laboratoř molekulárních markerů
Katedra botaniky PřF UP v Olomouci

IZOLACE DNA

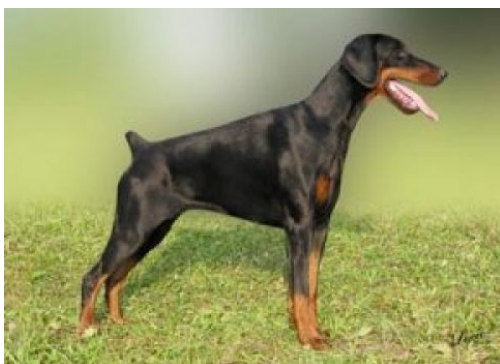
PCR

MOLEKULÁRNÍ MARKERY (AFLP, SSR)

SEKVENOVÁNÍ DNA

Viditeľne polymorfismy = fenotypový prejav vs. Genetický polymorfizmus

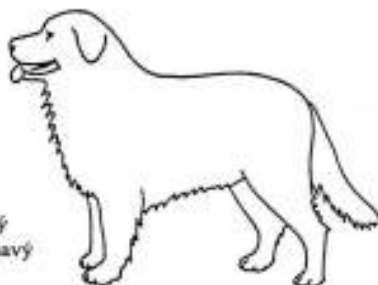
Pes domáci (*Canis lupus familiaris*)



Viditelné polymorfismy – omezený počet variant (kriterií) pro charakterizaci jedince

POSUDEK EXTERIÉRU PSŮ ZNAČKAMI:

- + korektní – pozitivní znak
 - negativní
 T dlouhý T krátký
 I vysoký I hluboký
 II úzký
 O příliš vyvinutý
 C měkký, prohnutý, konkávní
 C vyklenutý, konvexní
 I strmý > přeúhlený
 C postoje – kravský \ sblhávý
 C rozvěšený
 † vytažené břicho ~ volný



I. CELKOVÝ VZHLED:

- 0 celkové netypický
 1 příliš lehký (typ setra)
 2 malý, pes 63 a méně - BSP, 49 a méně - ASP, 43 a méně - ESP, 64 a méně - VŠSP
 fena 57 a méně - BSP, 47 a méně - ASP, 41 a méně - ESP, 59 a méně - VŠSP
 3 standardní výška, ale lehký
 4 korektní a mohutný, harmonická tělesná stavba, BSP - pes 64-66 cm, fena 58-60 cm,
 ASP - pes 50-53 cm, fena 48-51 cm, ESP - pes 44-48 cm, fena 42-46 cm, VŠSP - pes
 65-68 cm, fena 60-63 cm
 5 korektní a mohutný, harmonická tělesná stavba, BSP - pes 67-71 cm, fena 61-66 cm,
 ASP - pes 54-58 cm, fena 52-56 cm, ESP - pes 49-52 cm, fena 47-50 cm, VŠSP - pes
 66-72 cm, fena 64-68 cm
 6 vyšší než standardní, ale přesto typický a harmonický
 7 standardní výška, ale hrubý a málo harmonický
 8 příliš velký, hrubý, netypický
 9 příliš velký, lyfatický

II. BARVA OKA:

- 0 černá
 1 černohnědá
 2 tmavěhnědá
 3 středněhnědá
 4 červenohnědá
 5 světlehnědá
 6 žlutohnědá
 7 žlutá
 8 žlutobílá
 9 nepigmentovaná duhovka
 nebo jiná barva oka

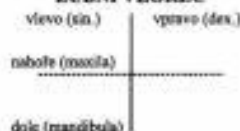
III. ZUBY:

- 0 úzký, v trojúhelníku, v silném oblouku
 1 šikmé čelisti, značně nepravidelně uložené řezáky
 2 podkus
 3 lehký podkus
 4 volný skus nůžkový
 5 nůžkový skus
 6 těsný skus nůžkový
 7 klešťový skus
 8 lehký předkus (nepravidelné řezáky)
 9 předkus

SYMBOLY OLIGODENTIE:

- i chybění jednoho nebo více řezáků
 c chybění jednoho nebo více špičáků
 p chybění jednoho nebo více velkých premolárů
 m chybění jednoho nebo více velkých molárů (m_1, m_2)
 x chybění jednoho nebo více malých premolárů (p_1)
 y chybění jednoho nebo více malých molárů (m_1)

ZUBNÍ VZOREC



IV. TĚLESNÁ STAVBA:

- A ve všech pozicích odpovídá standardu (níže uvedená vada nebrání využití v chovu)
 B dlouhá, úzká hlava, příliš lehký nebo špičatý čenich
 C lymfatická hlava, krátký, neúměrně prostorný čenich
 D měkký stop, plochá partie lebeční
 E příliš hluboký, strmý stop, příliš klenutá lebeční partie
 F vystupující vyklenuté tváře
 G otevřené pysky, volná kůže pod krkem
 H vadný tvar a výraz oka
 0 - entropium
 1 - malé oko - mikropthalmus
 2 - úzce otevřené, šterbinovitě
 3 - slzotok (Epiphora)
 4 - viditelná bělma (Sclera)
 5 - kulaté oko/mandlové oko u ESP
 6 - viditelná mžurka
 7 - viditelná spojivka
 8 - nepigment. nebo částečně pigment. víčka
 9 - ektrópium
 I dlouhé, nízko nasazené ucho
 J lehké, příliš vysoko nasazené, odstávající ucho
 K příliš krátký krk
 L vadné postavení a úhlní hrudních končetin
 0 - úzké
 1 - sblhávě
 2 - vbočené tlapy
 3 - vybočené tlapy
 4 - francouzský postoj
 5 - volná lopatka
 6 - přeúhlené v ramenním kloubu
 7 - strmé v ramenním kloubu
 8 - volné lokty
 9 - měkké nadprstí
 M nedostatečné proporce hrudníku, malé předhrudí
 N příliš dlouhý, měkký hřbet
 O vyklenutá partie hřbetu, beder
 P přestavěný
 Q krátká spadající zád
 R krátký ocas
 S vadně nesený nebo deformovaný ocas
 0 - vtažený mezi nohy
 1 - vysoko nesený za pohyb
 2 - vysoko držený i v klidu
 3 - vysoko nesený nad hřbet
 4 - na stranu nesený
 5 - v dolní třetině stočený (háčkuje)
 6 - stočený
 7 - deformovaný
 8 - nedostatečně osrstěný
 9 - vlákovitý
 T vadné postavení a úhlní pánevních končetin
 0 - úzké
 1 - sblhávě
 2 - vbočené tlapy
 3 - vybočené tlapy
 4 - kravské
 5 - sušovitě
 6 - strmé v kolenním kloubu
 7 - přeúhlené v kolenním kloubu
 8 - strmý hlezňový kloub
 9 - přeúhlený hlezňový kloub
 U rozvěšené nebo dlouhé (zaječ) tlapy
 V vady základní černé barvy
 W vady pálení - příliš světlé pálení
 X zakouřené pálení
 Y vadné osrstění
 0 - krátkosrstý
 1 - nedostatečná podsada
 2 - nedostatečně dlouhé
 3 - řídká srst
 4 - otevřené
 5 - mírně zvlněné
 6 - silně zvlněné
 7 - kudmaně
 8 - vystupující podsada
 9 - příliš dlouhá jemná srst
 Z vadné chody
 0 - krátké, vázané
 1 - úzké nebo překrač. vepředu
 2 - úzké nebo překrač. vzadu
 3 - vysoké
 4 - málo prostorné
 5 - nedostatečný posun zádi
 6 - málo pevné
 7 - volné lopatky nebo lokty
 8 - nejisté, proslapuje
 9 - mimochoď

Bonitační kód: 425 ASTYy 55 A,
Chovný 1

vzhled 4 korektní a mohutný,
harmonická tělesná stavba

Barva oka 2 tmavo hnědá

Zuby 5 nůžkový skus

Tělesná stavba

A ve všech pozicích odpovídající
standardu

S krátká spadající zád'

T krátký ocas

Yy zvlněná srst

Rozložení bílých znaků 5 typické

Povaha 5 vyrovnaná, sebejistá

Displazie kyčelních kloubů A 0/0 (tzn.
naprosto korektní)

GENSERVICE, s.r.o.,

ČIA akreditovaná laboratoř molekulární genetiky a cytogenetiky č. 1097

Palackého 1 - 3, 612 42 Brno

IČO : 25326694

DIČ: CZ. 25326694

Tel. 541562186

fax: 5415622187

e-mail: genservice@volny.cz

www.almara.cz/genservice

ZKUŠEBNÍ PROTOKOL

Osvědčení o stanovení genetického typu bernského salašnického psa

Č. protokolu: 48/06

Počet stran : 1 z 1

Identifikace zvířete :

Ident. rodičů : Otec : ----

lab.číslo:

Jméno : ARTUŠ z Michalského stromořadí

Matka : ----

lab.číslo:

Tetovací číslo : 3190

Narození : ----

Plemeno : bernský salašnický pes

Pohlaví : pes

Č. zápisu v plemen knize: BSP/3190/02/05

Laboratorní číslo : 10E/06

Datum příjmu biol.vzorku: 19.1.2006

Zdroj DNA: krev

Zkušební metoda : DNA test

Proveden :

Vyšetřované lokusy	
PEZ 1	118 / 118
PEZ 3	- / 123
PEZ 5	102 / 102
PEZ 6	180 / 184
PEZ 8	227 / 231
PEZ 12	276 / 300
PEZ 20	175 / 179
FHC 2010	227 / 235
FHC 2054	155 / 163
FHC 2079	269 / 269

Výsledek stanovení genetického typu - interpretace DNA testu: **individuální DNA profil**

Zákazník – majitel výsledků : Václav Švec, Velhartice 35, 341 42 Kolínec

V Brně, dne 15.2.2006

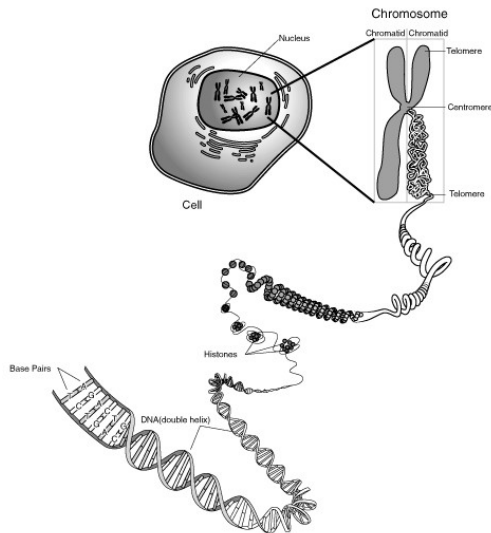
MVDr. Alena Hovorková
vedoucí laboratoře



Uložení genetické informace

Jádro

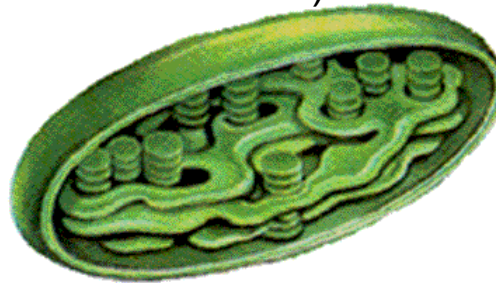
- různá ploidie
- rekombinace
- biparentální přenos
- především nekódující úseky repetitivní DNA (junk DNA, selfish DNA)



Plastidy

cpDNA = chloroplastová DNA

- 1 kruhová molekula
- 135 – 160kb
- především **kódující sekvence**
- bez rekombinace
- **uniparentální přenos** (2/3 vyš. rostl - maternálně)



Mitochondrie

mtDNA

- 1 kruhová molekula
- 370 – 490 kb
- člověk 16,6kb; 37 genů
- **geny pouze 10%**



Velikost genomu

bakterie *Haemophilus influenzae*

- první osekvenovaný, výjimečně malý genom
- 1.8 Mb a 1740 genů

Arabidopsis thaliana

- první osekvenovaný genom rostlin (2000)
- 27 000 genů
- 157 Mb (na rostliny poměrně malý genom)

Paris japonica

- 150 Gb
- největší známý genom vůbec
- z čeledi kýchavicovité

Homo sapiens

- 23 – 25 000 genů
- 3,2 Gb (cca 3pg DNA)

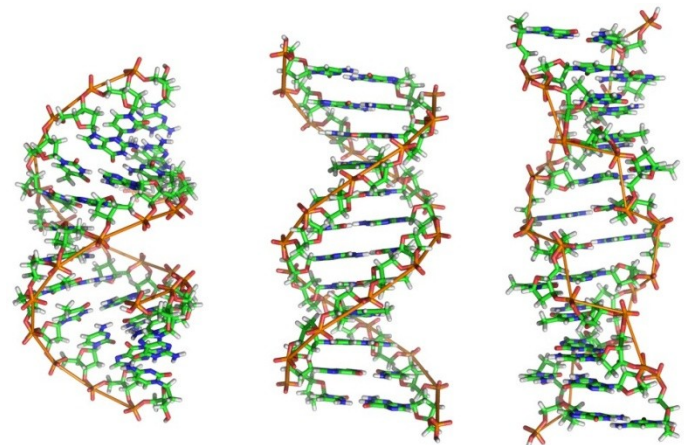
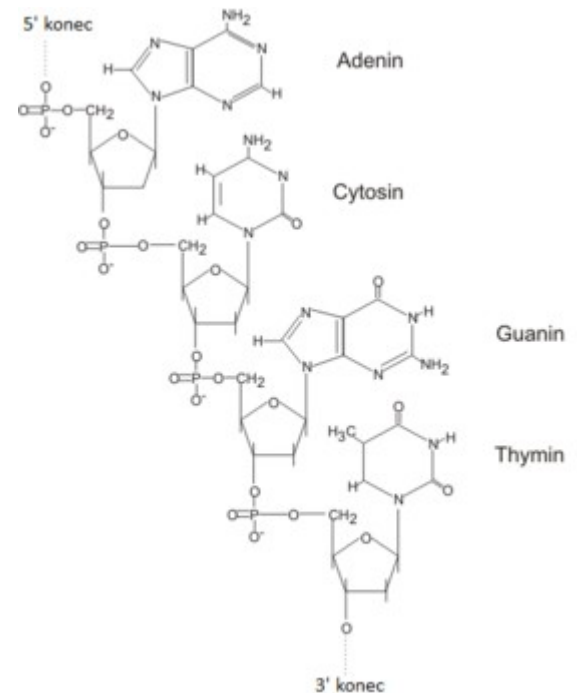
Protopterus aethiopicus

- bahník mramorovaný
- 130Gb
- největší známý genom obratlovců



DNA

- Deoxyribonukleová kyselina
- Komplementární řetězce
- Antiparalelní = 5' – 3' a 3' – 5' řetězce
- Nese genetickou informaci
- Uložena převážně v chromozomech
- Tvořena dusíkatými bázemi A – adenin, T – tymin, C – cytosin, G – guanin
- Pořadí tří bazí kóduje aminokyselinu v polypeptidivém řetězci



Izolace DNA

- První krok většiny analýz NK
- Odstranění inhibitorů, které blokují činnost enzymů v následných analýzách
- Volba metody extrakce NK závisí na:
 - Typu molekuly, kterou chceme extrahovat (genomová=genomická DNA, plazmidová DNA, fragment DNA z agarózového gelu, RNA)
 - Typu buněk z nichž má být NK izolována
 - Požadované čistotě NK
 - Požadovaném množství NK
- Často je výhodnější získat DNA ve vyšší kvalitě na úkor výtěžku izolace

Metody izolace DNA

Metody využívající rozdíly v rozpustnosti DNA v různých roztocích

- Obecně rozšířené, široce aplikované postupy
- Metody vhodné pro vysokomolekulární genomické NK
- extrakce fenolem, CTAB metoda – viz dál

Metody adsorpční

- DNA se váže na křemičité částice v přítomnosti chaotropní látky
- Rychlá purifikace plazmidů
- Zisk malých fragmentů DNA s vysoký výtěžkem
- Zisk vysokomolekulární DNA s nižším výtěžkem
- Podstata komerčních kitů \$ \$ \$ € € €
-

Metody založené na magnetických částicích

- Modifikovaný povrch částic s vysokou afinitou pro NK
- Imobilizace částic pomocí magnetu, centrifugace, eluce vhodným roztokem
- \$ \$ \$ € € € \$

Další metody:

- Centrifugace v hustotním gradientu
- Izolace plazmidové DNA – alkalická lyze
- ..
- .

- Výchozí materiál:
 - **Jednotlivé buňky nebo jejich kultury (kvasinky)**
 - **Části pletiv, tkání, orgánů**
 - **Virové částice**
 - **Fragmenty DNA z agarózových gelů**

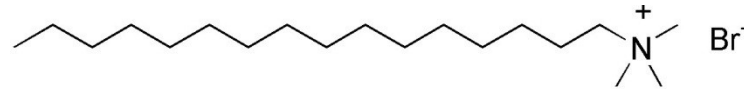
Izolace DNA – homogenizace materiálu

- 1) Klasika – porcelánová miska, tlouček,
 - přídavek mořského písku, tekutý dusík

2) Homogenizační mlýny



Izolace DNA – metoda CTAB



1) CTAB

(cetyltrimethylamoniumbromid)

- detergent, který uvolňuje DNA z membrán a proteinů
- vytváří komplex s nukleovými kyselinami, rozpustný při vysoké koncentraci solí (0,7M NaCl), ale při snížené koncentraci solí (0,45M NaCl) vytváří sraženinu.

CTAB má jinou rozpustnost než DNA – lze oddělit od DNA v dostatečné kvalitě

Izolace DNA

CTAB metoda

- homogenizace materiálu
- rozrušení buněčných stěn pomocí enzymů a detergentů (lyzozym, celulázy) při teplotě 65°-68°C
- aplikace chloroformu (denaturuje proteiny, rozpouští tuky, odděluje fáze)
- centrifugace
- vysrážení nukleových kyselin (NK) etanolem nebo izopropanolem
- izolace precipitátu NK centrifugací, vysušení NK
- rozpustění získaného sedimentu ve vhodném roztoku
- Uchování DNA
 - chladnička 4°C – pro okamžité použití
 - hlubokomrazicí box -80°C pro dlouhodobé uchovávání



Supernatant: vodná fáze s extrahovanou DNA –
odpipetujeme a **dále s ní pracujeme pracujeme)**

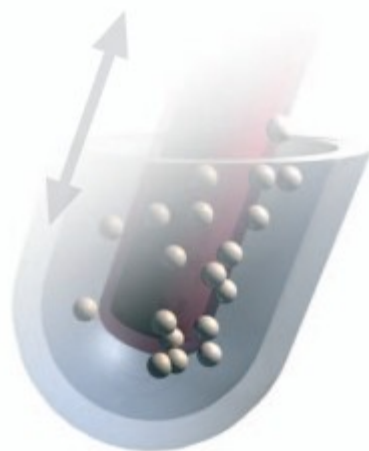
úzký pás proteinů - ODPAD
zbytky rostlinného materiálu, ODPAD



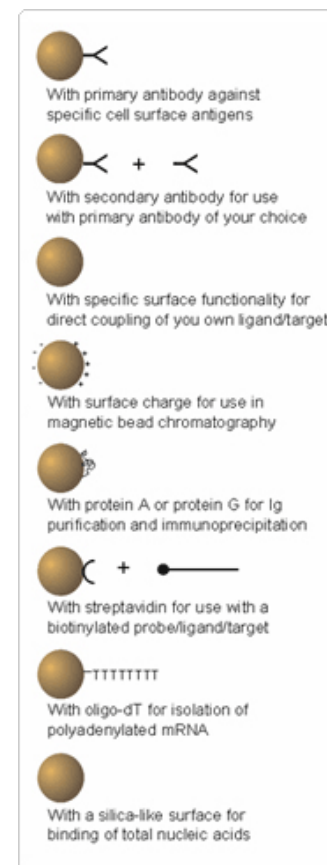
Izolace DNA – magnetické částice

Izolační kity pro izolaci genomické DNA, total RNA nebo DNA a/nebo RNA z patogenů
– magnetické částice (InviMag beads, Dynabeads) pro purifikaci NK 15, 24 nebo 96 vzorků naráz v jednom běhu (podle typu přístroje)

– DNA se váže na magnetické částice, které jsou přístrojem v konečném kroku izolovány ze vzorku

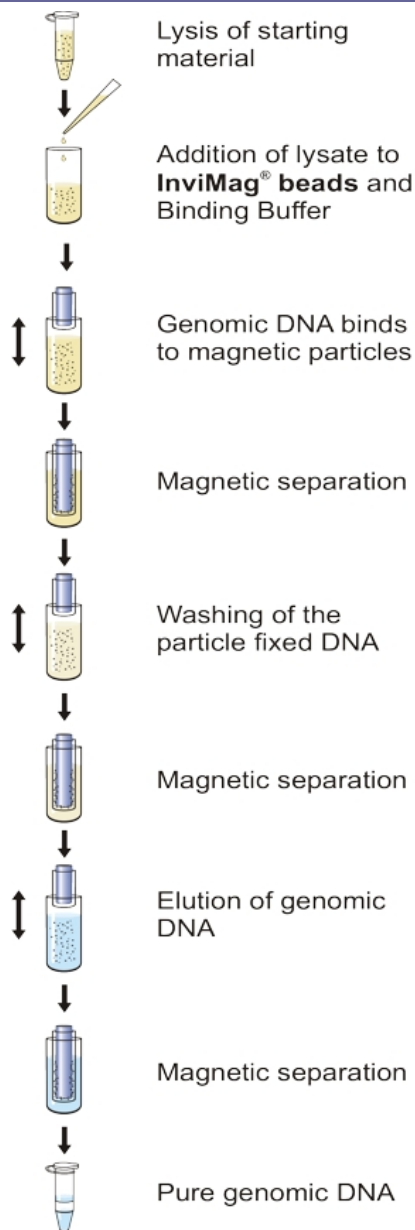
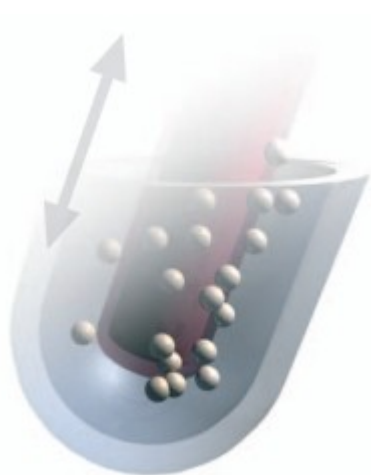


KingFisher Systems

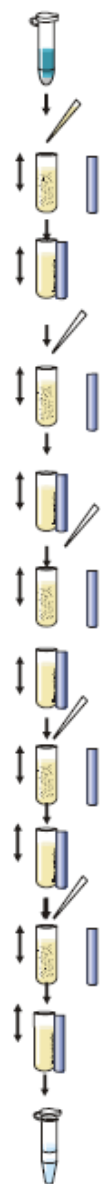


Izolace DNA – automatizované metody

Postup izolace DNA pomocí izolačního kitu pro automatické stanice



Scheme of the InviMag® Plant DNA Mini Kit



Please read protocols prior the start of the preparation carefully

Transfer homogenized starting material into a 1.5 ml reaction tube (not provided).
Add 400 µl of Lysis Buffer P and 20 µl of Proteinase K to the 1.5 ml reaction Tube

Vortex the tube for 5 sec and incubate the sample at 65°C for app. 30 min under continuously shaking (e.g. by using a thermomixer).

After lysis time centrifuge the 1.5 ml reaction tube at max. speed for 1 minute to pellet down the unlysed material. Transfer the supernatant from the lysed sample carefully into a 1.5 ml reaction tube.

Add 200 µl Binding Buffer P, add 20 µl of SNAP Solution to the lysate, Mix by pipetting 5 times
Incubate for 5 min at RT

Insert the Magnetic Stripe
Incubate again for 5 min at RT
Removal of supernatant by aspiration or pipetting

Remove Magnetic Stripe
Add 500µl Wash Buffer I
Close the vial and mix by vortexing

Insert the Magnetic Stripe
Incubate for 5min at RT
Removal of the Wash Buffer I eluate by aspiration or pipetting

Remove Magnetic Stripe
Add 800 µl Wash Buffer II
Close the vial and mix by vortexing

Insert the Magnetic Stripe
Incubate for 3 min at RT
Removal of the Wash Buffer II eluate by aspiration or pipetting

Remove Magnetic Stripe
Repeat this step from point (A)

Insert the Magnetic Stripe, open the lid
Incubate for 5 min at RT to evaporate ethanol
Remove Magnetic Stripe

Add 100 µl preheated Elution Buffer D
Mix by vortexing
Incubate for 5 min at RT

Insert the Magnetic Stripe
Incubate for 3 min at RT

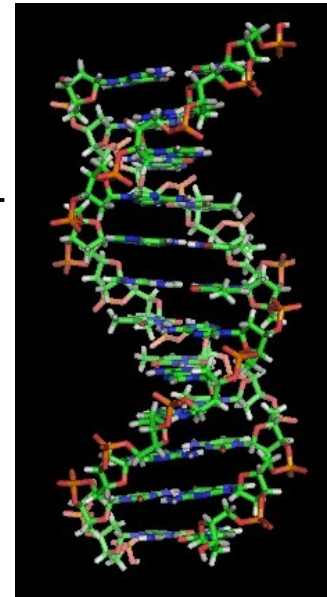
Postup izolace DNA
pomocí izolačního kitu –
manuálně bez přístroje

Příklad dostupných kitů – firma Invitex

Sample Source	Recommended Kit	Sample Volume	Yield
Genomic DNA Purification			
Whole human or animal blood, buffy coat, bone marrow, rinse liquid from swabs	<u>InviMag Blood DNA Mini Kit/ KFmL</u>	up to 200 µl	6 -10 µg
Fresh or frozen tissue, rodent tail, paraffin embedded tissue, mammalian cells	<u>InviMag Tissue DNA Mini Kit/ KFmL</u>	5 - 20 mg tissue sample, 0.5 cm rodent tail, 10 –10 ⁶ mammalian cells	10 – 25 µg
Saliva, swabs	<u>InviMag SalivaGene DNA Kit/ KFmL</u>	500 µl	up to 10 µg
Human and animal stool sample	<u>InviMag Stool DNA Mini Kit/ KFmL</u>	100 – 300 mg	up to 50 µg
Forensic material	<u>InviMag Forensic Kit/ KFmL</u>	depending on type and amount of starting material	depending on type and amount of starting material
Plant material	<u>InviMag Plant DNA Mini Kit/ KFmL</u>	up to 100 mg	5 – 25 µg
Nucleic Acid Purification from Pathogens			
Bacterial DNA			
Bacteria pellets, tissue samples, paraffin embedded tissue, blood, cell-free body fluids, urine, paper points, water	<u>InviMag Bacteria DNA Mini Kit/ KFmL</u>	depending on type and amount of starting material	depending on starting material
Human and animal stool sample	<u>InviMag Stool DNA Mini Kit/ KFmL</u>	100 – 300 mg	up to 50 µg
Saliva, swabs	<u>InviMag SalivaGene DNA Kit/ KFmL</u>	500 µl	up to 10 µg
Viral DNA and/or RNA			
Serum, plasma, cell-free body fluids, rinse liquid from swabs, cell culture supernatants, tissue biopsies	<u>InviMag Virus DNA/RNA Mini Kit/ KFmL</u>	up to 200 µl up to 10 mg	depending on starting material
Viral RNA			
Plasma, serum, cell-free body fluids, rinse liquid from swabs, stool samples, small tissue samples, cell culture supernatants	<u>InviMag Virus RNA Mini Kit/ KFmL</u>	up to 200 µl up to 50 mg	depending on viral load
Viral DNA			
Plasma, serum, whole blood, cell-free body fluids, rinse liquid from swabs, cell culture supernatants	<u>InviMag Virus DNA Mini Kit/ KFmL</u>	up to 200 µl	depending on viral load
Total RNA isolation			
Human or animal cells, lymphocytes pellet, tissue samples	<u>InviMag Universal RNA Mini Kit/ KFmL</u>	5 x 10 ⁶ cells up to 1.0 ml blood up to 20 mg	up to 20 µg

Izolace DNA – adsorpce na silikát

- DNA v přítomnosti tzv. chaotropních solí (jodid sodný nebo ionty guanidinu) adheruje na silikátový povrch (sklo).
- K roztoku, obsahujícímu zlyzovaný buněčný obsah, se přidává chaotropní sůl a suspenze silikátových částic
- Protřepáváním směsi se usnadňuje vazba DNA na částice.
- Ostatní sloučeniny zůstávají v roztoku a lze je pak elegantně odstranit – částice necháme usadit nebo centrifugujeme
- Odsajeme roztok nad částicemi a propláchneme novou dávkou pufru s chaotropními solemi.
- Přečištěnou DNA na povrchu částic lze snadno uvolnit přidáním vody nebo vhodného pufru, který neobsahuje chaotropní soli.
- Po odstředění zůstanou na dně jen samotné částice, nad nimi je čistý roztok DNA.

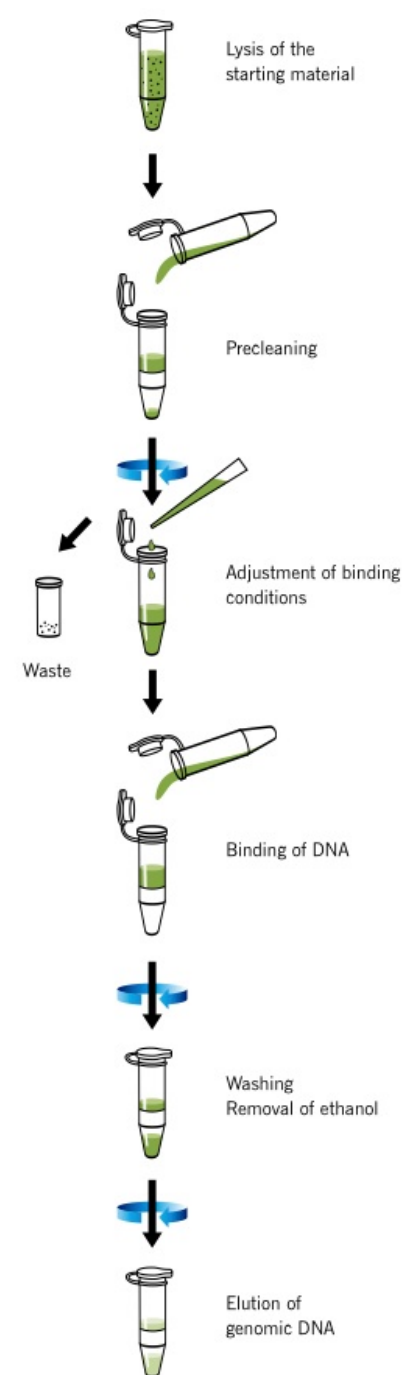


Výhodou metody založené na adsorpci na silikát je rychlost a pohodlnost, proto jsou na ní založeny komerční soupravy (kity) pro rutinní extrakce DNA.

Izolace DNA – komerční kity

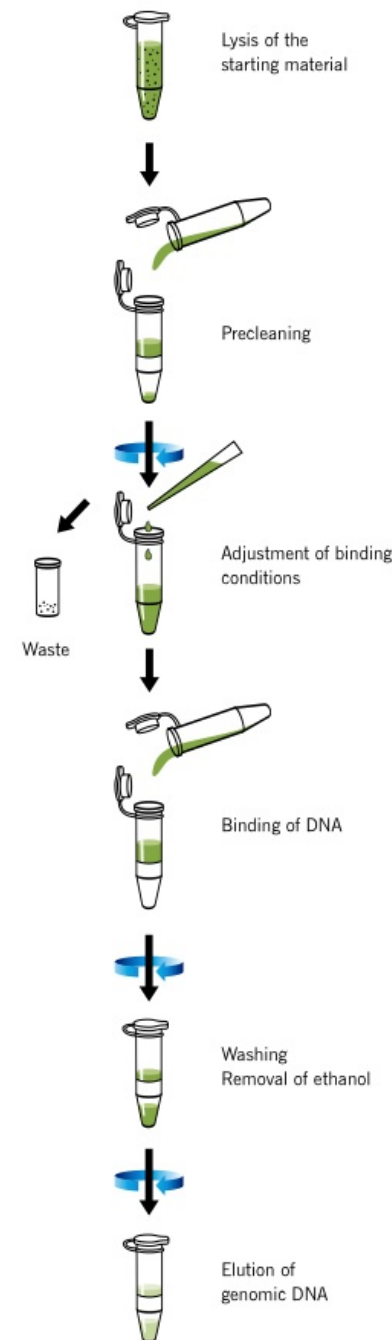
Princip:

- lýze buněk
- vysrážení DNA ethanolem a navázání na silikátovou membránu kolonky
(vysoký obsah solí, pH < 7)
- promytí navázané DNA
- eluce – uvolnění promyté DNA z kolonky do zkumavky
(nízký obsah solí, pH > 7)



Izolace DNA – př. izolační kity Invitrek

Typ vzorku	Doporučený Kit	Objem vzorku	Výtěžek
Krev, „buffy coat“ – frakce leukocytů a trombocytů po ultracentrifugaci	Invisorb Spin Micro DNA Kit Invisorb Spin Blood Mini Kit Invisorb Spin Blood Midi Kit Invisorb Spin Blood Maxi Kit Invisorb Blood Giga Kit Invisorb Blood Universal Kit	1 - 50 μ l 1 - 200 μ l 200 μ l - 2 ml 1 - 10 ml 0.2 - 20 ml 1 ml - 10 ml	1 - 2 μ g up to 10 μ g up to 60 μ g up to 300 μ g up to 600 μ g up to 400 μ g
Tělní tekutiny, kostní dřeň	Invisorb Spin Micro DNA Kit Invisorb Spin Blood Mini Kit Invisorb Genomic Kit III	1 - 50 μ l 1 - 200 μ l 1 - 200 μ l	depending on type and amount of starting material
Lidské a zvířecí tkáň, tkáň zalité v parafinu	Invisorb Spin Micro DNA Kit Invisorb Spin Tissue Mini Kit Invisorb Spin Tissue Midi Kit Invisorb Spin FFPE Tissue Kit Invisorb Genomic Kit II	0.5 - 5 mg 0.5 - 40 mg 30 - 100 mg 2 - 3 paraffin sections 0.5 - 40 mg	1 - 2 μ g up to 50 μ g up to 80 μ g up to 50 μ g up to 50 μ g
Lidské a zvířecí buňky	Invisorb Spin Micro DNA Kit Invisorb Spin Tissue Mini Kit Invisorb Spin Tissue Midi Kit Invisorb Genomic Kit III Invisorb Spin Cell Mini Kit	100 - 10 ⁵ cells 10 - 10 ⁷ cells 10 ⁶ - 10 ⁸ cells 1 x 10 ⁵ cells 2 x 10 ⁶ cells	depending on type and amount of starting material
Suspenze kvasinkových buněk	Invisorb Spin Yeast DNA Mini Kit Invisorb Genomic Kit III	10 ⁷ cells, swab 3 - 10 ml bacterial or yeast suspension	depending on type of starting material
Swab material = výtěry	Invisorb Spin Swab Kit Invisorb Genomic Kit III Invisorb Spin Cell Mini Kit	depending on starting material	depending on starting material
Forensic material	Invisorb Spin Forensic Kit Invisorb Forensic Kit I	depending on type and amount of starting material	depending on type and amount of starting material
Plant material	Invisorb Spin Plant Mini Kit Invisorb Spin Plant Midi Kit	up to 100 mg up to 500 mg	5 - 35 μ g up to 140 μ g
Potraviny rostlinného/živočišného původu	Invisorb Spin Food Kit I (animal) Invisorb Spin Food Kit II (plant)	0.5 - 40 mg up to 100 mg	up to 50 μ g up to 50 μ g



Odběr vzorků DNA, uchovávání a purifikace pomocí „FTA karet“

FTATM Nucleic Acid Collection, Storage and Purification

Home | Nucleic Acid and Protein Sample Preparation | FTATM and FTATM Elute | FTATM Nucleic Acid Collection, Storage and Purification

FTA Cards contain chemicals that lyse cells, denature proteins and protect nucleic acids from nucleases, oxidative, and UV damage. US Patent Nos. 5496562, 5756126, 5807527, 5972386, 5985327 and other patents pending.

Advantages and benefits

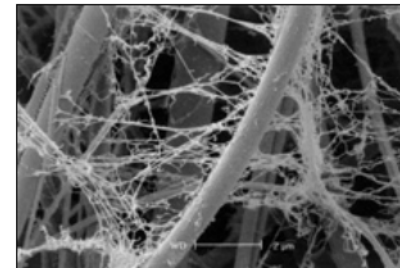
- Capture nucleic acid in one easy step
- Captured nucleic acid is ready for downstream applications in less than 30 minutes
- DNA collected on FTA Cards is preserved for years at room temperature
- FTA Cards are stored at room temperature before and after sample application, reducing the need for laboratory freezers
- Suitable for virtually any cell type
- Indicating FTA Cards change color upon sample application to facilitate handling of colorless samples
- FTA Cards are available in a variety of configurations to meet application requirements
- Custom configurations are available on request

Use FTA for a wide range of applications:

- Forensics
- Transgenic identification
- Transfusion medicine
- Plasmid screening
- Food and agriculture testing
- Drug discovery
- Genomics
- STR analysis
- Animal identification



Whatman FTA devices format



Electron micrograph showing DNA entrapped within the FTA matrix (Magnification x 10,000)

Izolace DNA – stanovení koncentrace a čistoty

1: spektrofotometricky

– vzorky dostatečně čisté, významně nekontaminované

– Princip:

– NK absorbují UV záření s maximem absorbance v oblasti okolo 260 nm

– Proteiny mají maximum absorbance v oblasti okolo 280 nm.

– Stupeň čistoty NK stanovujeme z poměru absorbance při 260 nm a 280 nm ($R_{260/280}$).

– Pro genomickou nebo plazmidovou DNA:

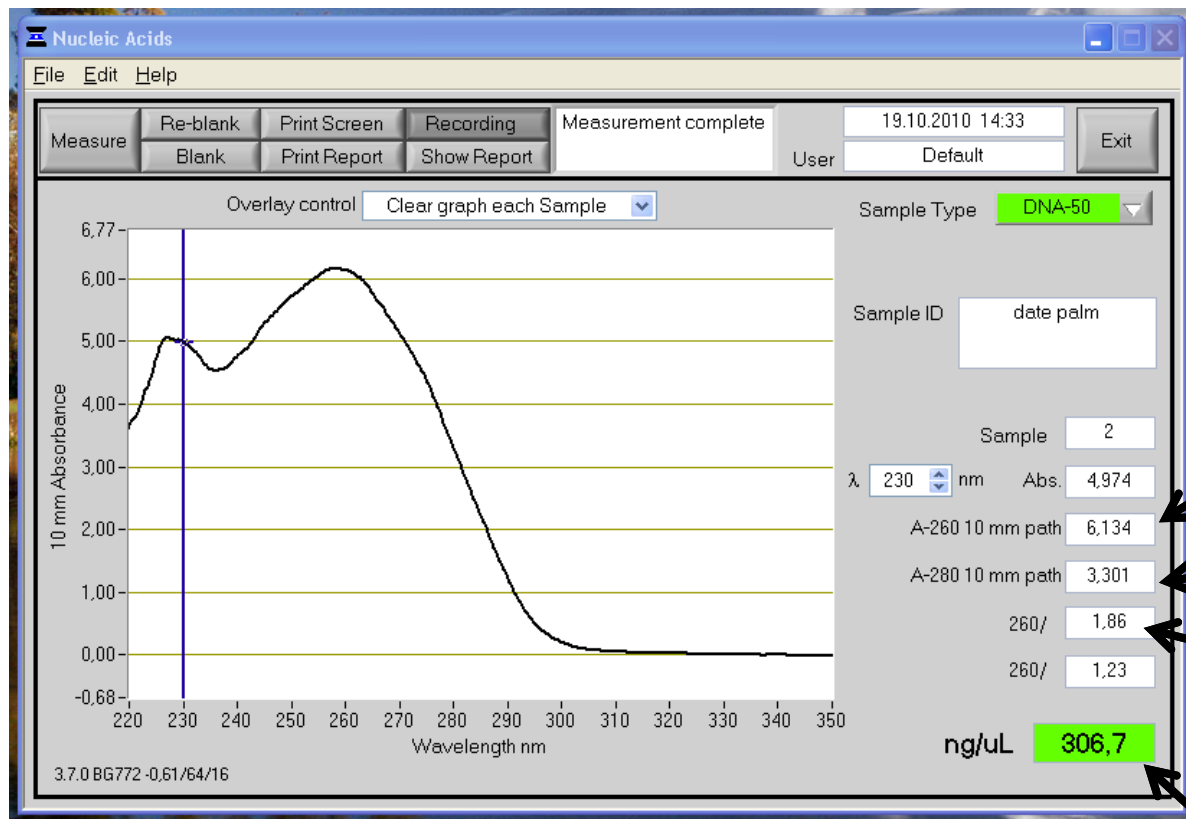
a) $R_{260/280} =$ od 1,8 do 2,0 (blíží 1,8) = OK!

b) $R_{260/280} < 1.8$ = kontaminace proteiny

c) $R_{260/280} > 2.0$ = kontaminace organickými sloučeninami (chloroformem, fenolem)

Izolace DNA – stanovení koncentrace a čistoty

1: spektrofotometrické stanovení – příklad – výstup měření na přístroji Nanodrop



A_{260} : absorbance NK

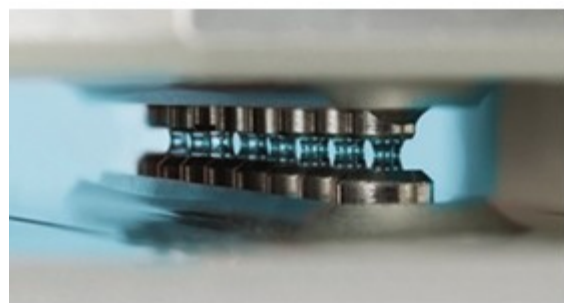
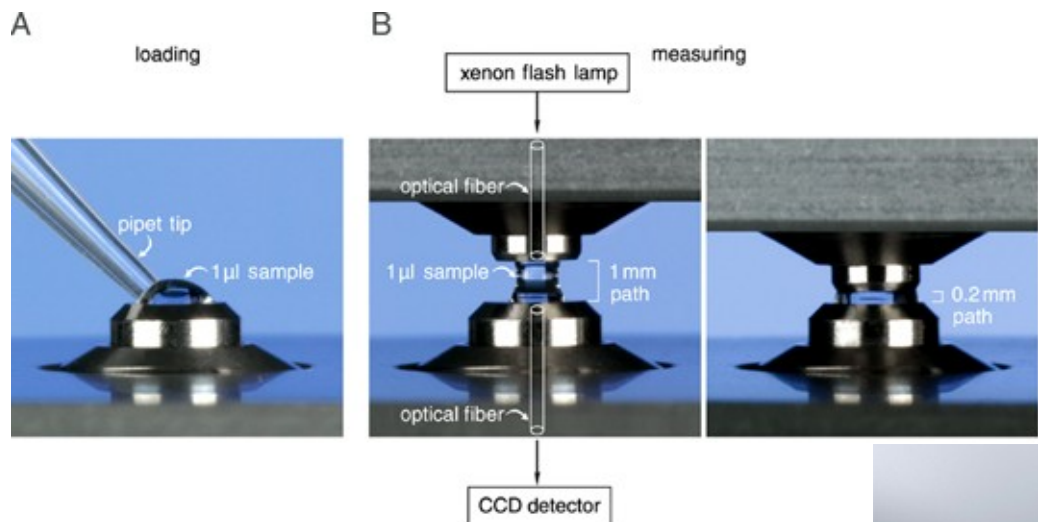
A_{280} : absorbance proteinů

$R_{260/280}$: kvalita NK

Výsledná koncentrace DNA

Izolace DNA – stanovení koncentrace a čistoty

1: spektrofotometrické stanovení – Nanodrop



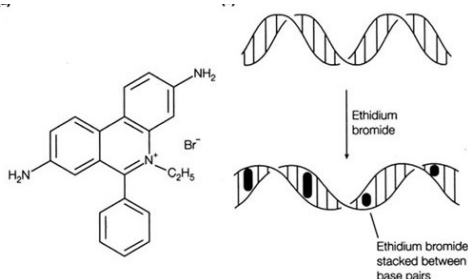
Izolace DNA – stanovení koncentrace a čistoty

2: fluorescenčně

- vzorky s nízkou koncentrací NK, znečištěné vzorky
 - Princip:
 - nanesení vzorků na agarosový gel s ethidiumbromidem
 - srovnání intenzity bandu se standardem o známé koncentraci
- komplex NK–ethidiumbromid produkuje po ozáření UV
červenooranžové světlo 590nm – **méně užívané**

Pozn: Ethidium bromid je látka hojně užívaná v molekulární biologii (detekce fragmentů) se vmezeřuje mezi sousední páry bazí a vytváří s NK komplex, který v UV svetle červeně fluoreskuje (DNA i RNA).

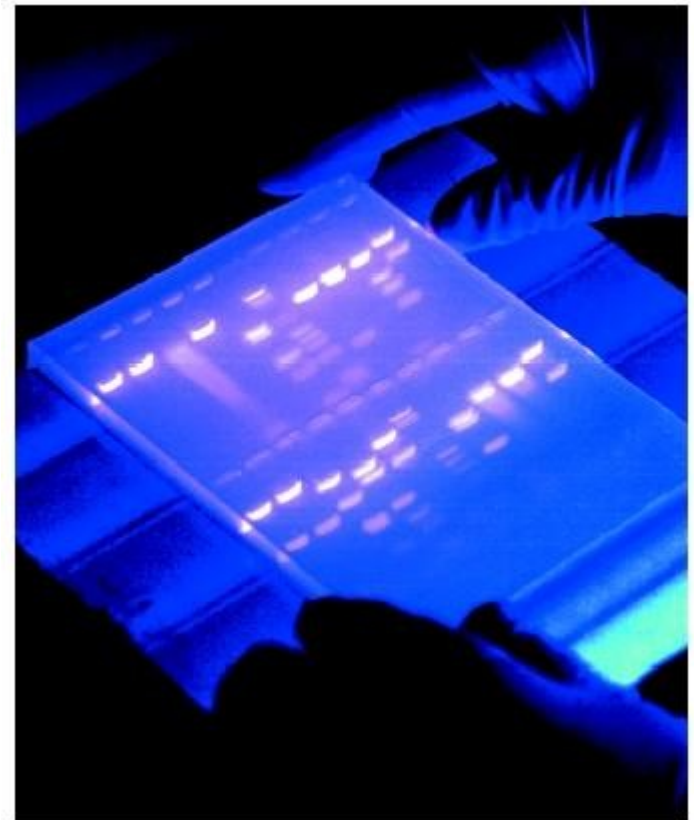
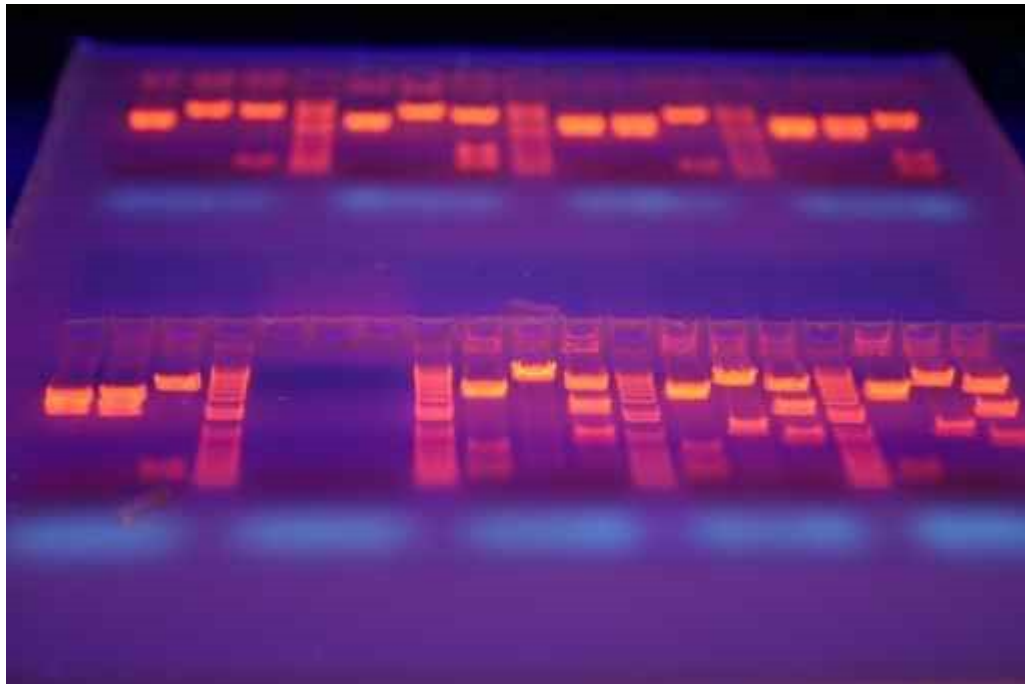
Vmezeřením se do DNA brání replikaci DNA (separaci dvoušroubovice) a navazujících reakcí – transkripce a translace = buňka umírá protože 1. nemůže se replikovat a 2. netvoří se proteiny potřebné pro její život === **toxický a mutagenní účinek!!!**



Izolace DNA – stanovení koncentrace a čistoty

Ověření kvality a integrity agarózovou elektroforézou

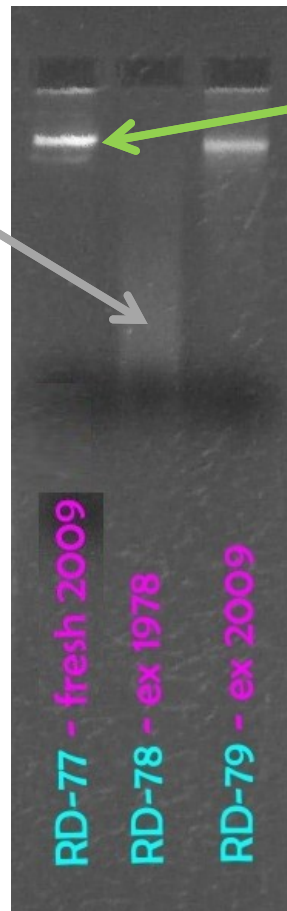
- po ukončení elfo není na gelu nic vidět
- Vizualizace UV světlem = v transiluminátoru s dokumentačním systémem



Izolace DNA – stanovení koncentrace a čistoty

Po průběhu elektroforézy:


degradovaná DNA




DNA!

Jednoduchý postup izolace DNA – demonstrační pokus

- **Homogenizace kousku jater (5–10g) v 10% roztoku kuchyňské soli a vysrážení DNA alkoholem**
 - Pomůcky: talířek, vidlička, nůž, solnička, slivovice (55–65%), kuchyňské cedítko (hrubé plátno)
 - Postup:
 - kousek jater zhomogenizovat pomocí vidličky
 - Zalít přiměřeným objemem 10% NaCl – popraskání stěn buněk, uvolnění DNA do roztoku
 - Filtrace přes plátno
 - Přídavek ethanolu = vysrážení DNA v podobě bílé hmoty

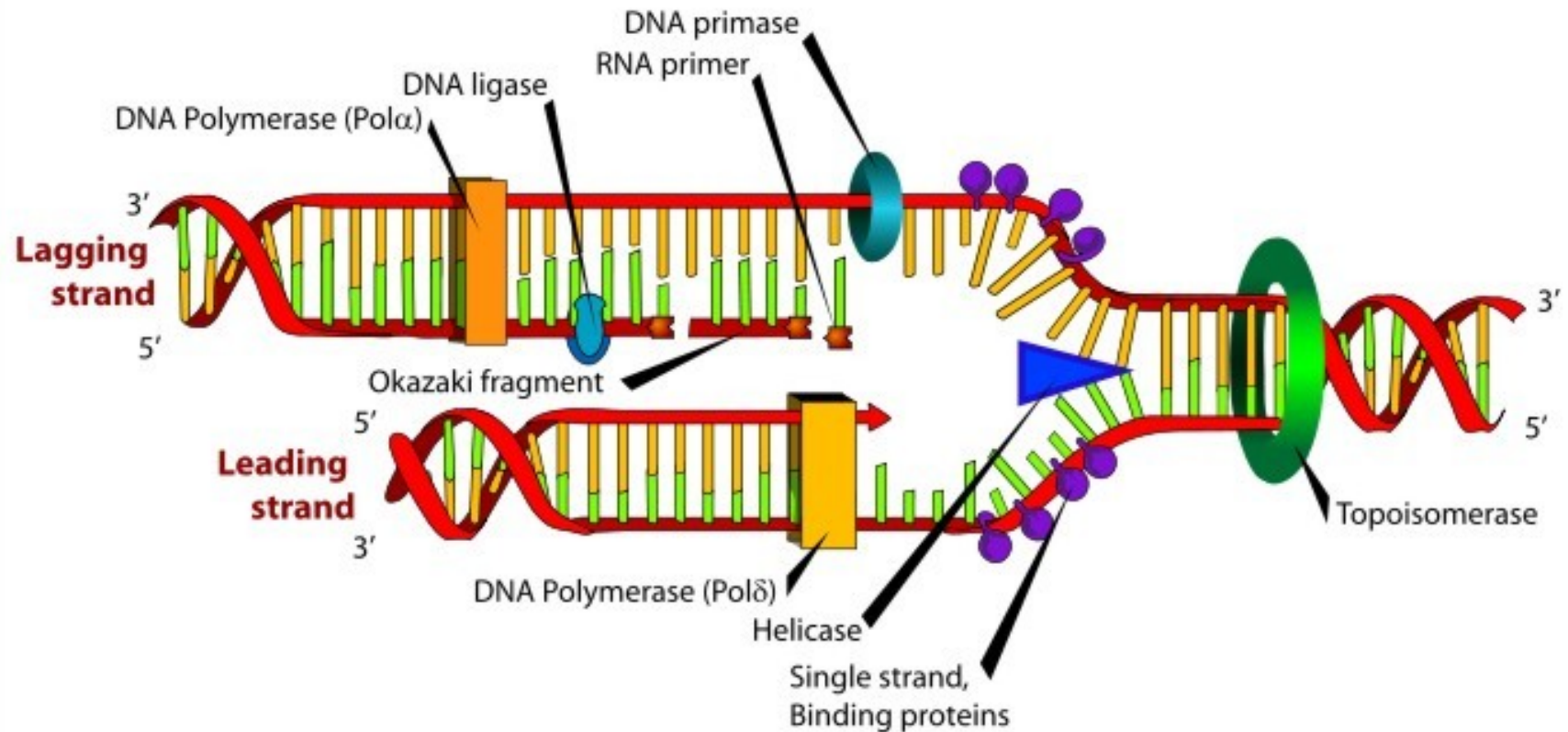
Jednoduchý postup izolace DNA – demonstrační pokus

- **Homogenizace jahod v roztoku detergentu a NaCl**
 - Pomůcky: igelitový sáček, vidlička, JAR, solnička, slivovice (55–65%), hrubé plátno nebo kuchyňské cedítko
 - Postup: jahody zhomogenizovat pomocí vidličky s přidavkem pár kapek soli a detergentu (JAR, PUR... = popraskání stěn buněk, uvolnění DNA do roztoku)
 - Filtrace přes plátno
 - Přídavek ethanolu = vysrážení DNA v podobě bílé hmoty

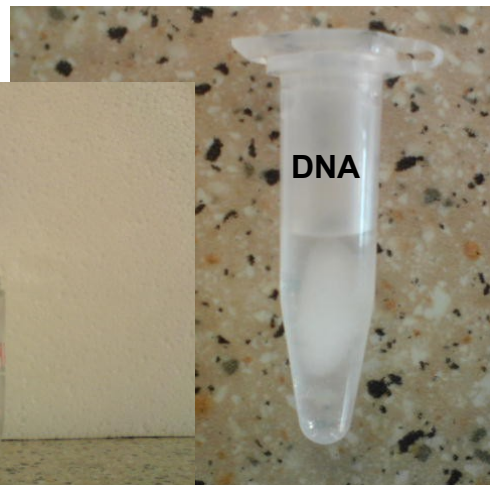
Jednoduchý postup izolace DNA – demonstrační pokus



Replikace „*in vivo*“



PCR – replikace „*in vitro*“



Princip PCR

- enzymatická syntéza DNA *in vitro* = syntéza vlákna DNA ve směru 5' - 3' enzymem
- pro zahájení reakce je nezbytný primer = syntetický oligonukleotid
- primer(y) označují oblast DNA, která se bude amplifikovat (a jsou komplementární k templátu)
- cyklické opakování reakce (25-40 x) – počet molekul PCR produktu narůstá geometrickou řadou
- po 30ti cyklech 10^{30} molekul

PCR – replikace „*in vitro*“

PCR – Polymerase Chain Reaction

Polymerázová řetězová reakce

- 1955 - objev DNA polymerázy a první pokusy s umělou syntézou většího množství DNA (amplifikace DNA)

- 1983 – **Karry Mullis** pracoval na projektu geneticky podmíněných chorob člověka v kalifornské firmě Cetus Corporation. Hledal novou metodu analýzy mutací DNA.

Modifikoval Sangerovu metodu sekvenace DNA – přidal zpětný primer pro syntézu krátkých úseků DNA.

Uvědomil si, že opakováním amplifikace DNA pomocí DNA polymerázy může vést k řetězovému množení specifického segmentu genomu - PCR.

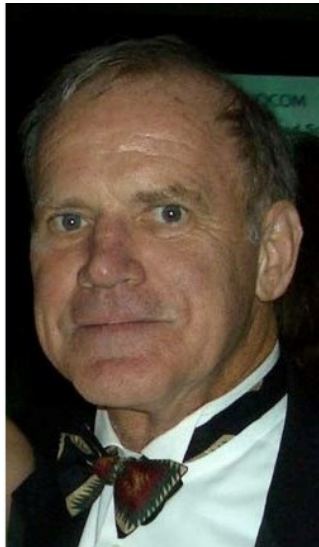
„Pomocí PCR můžete z jedné molekuly DNA vytvořit miliardy kopií za jedno odpoledne. Potřebujete jenom zkumavku, několik jednoduchých reagensů a zdroj tepla“

- 1984 – rozpracování metody s matematikem Fredem Faloounou, patentování (Mullis et al. 1986; Mullis a Faloona 1987)

-

- **1993 – Nobelova cena za chemii**

- V devadesátých letech Cetus Corp. prodává patenty „PCR a Taq“ firmě Hoffman–La Roche za 330 miliónů \$



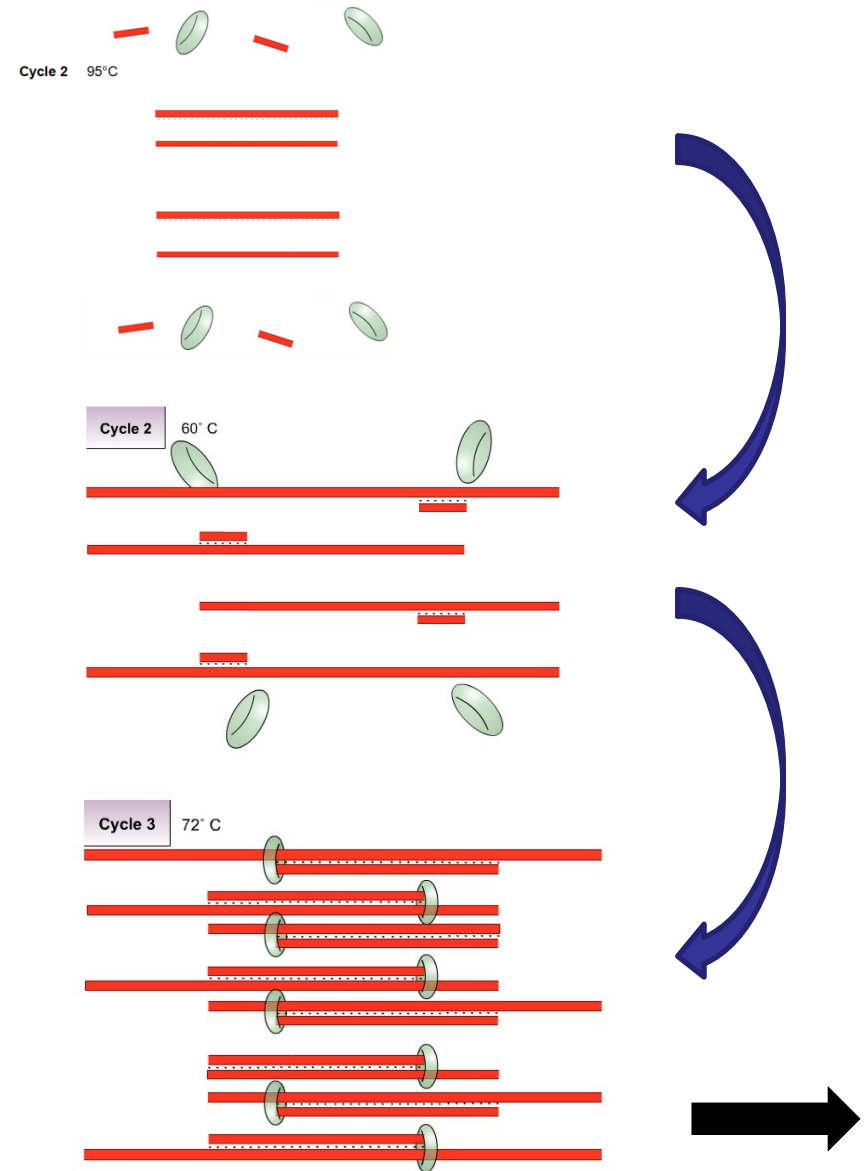
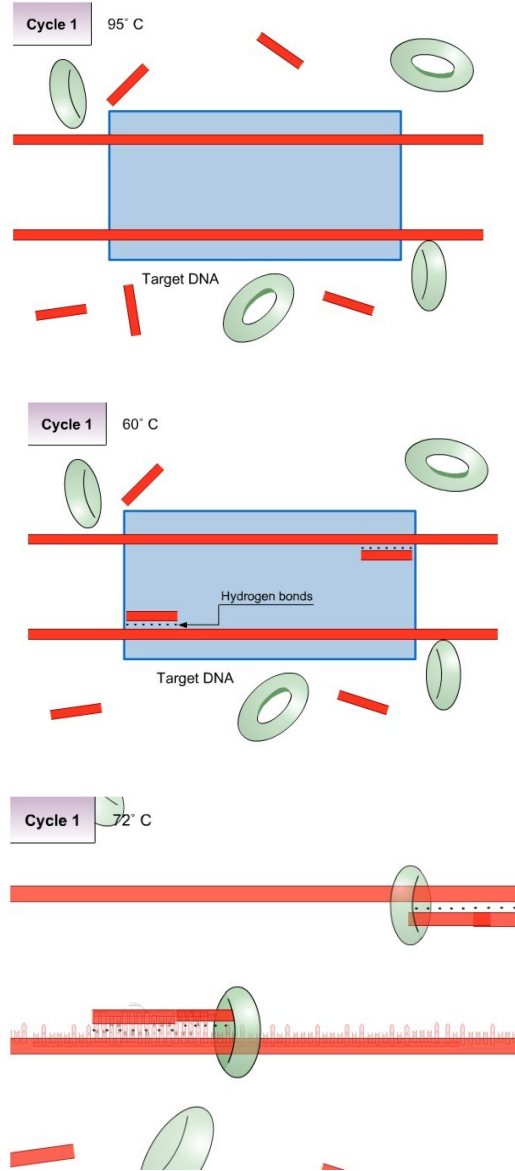
PCR – replikace „*in vitro*“

Složení PCR mixu

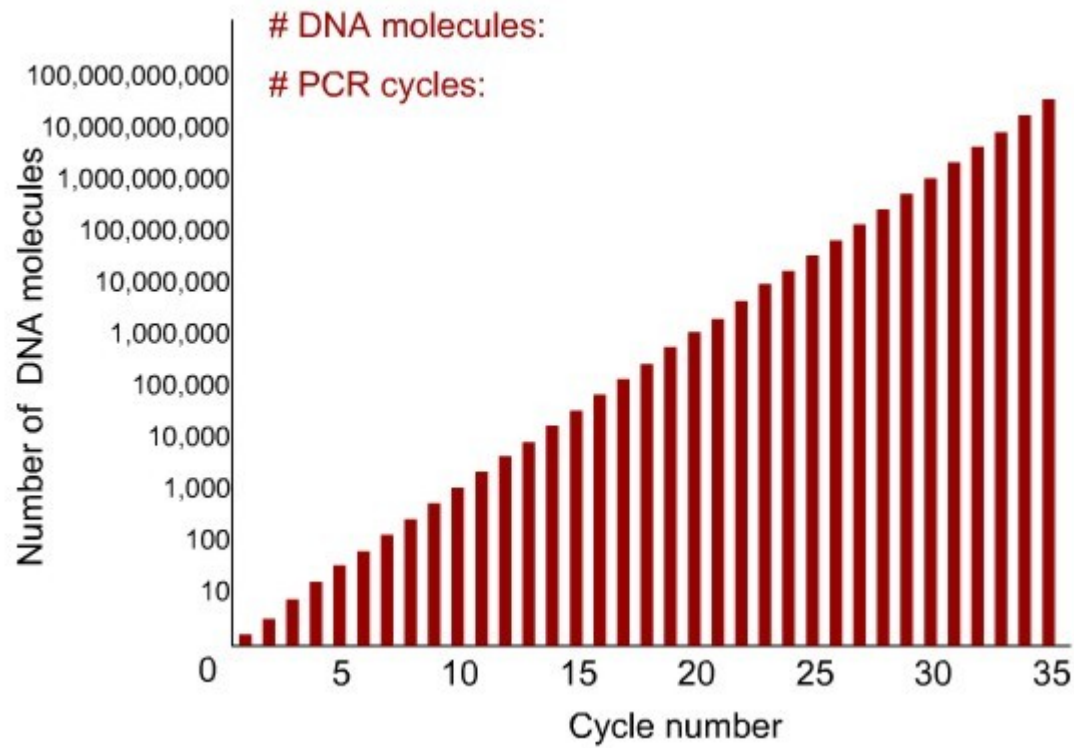
- redestilovaná sterilní voda
- pufr (dodávaný s polymerázou, pH = 8,3-9,0)
- hořčík ve formě hořečnatých iontů (často v pufru)
- nukleosidtrifosfáty (ATP, GTP, CTP, TTP)
- primery (přímý a zpětný)
- polymeráza
- templátová DNA



PCR – Polymerase Chain Reaction



PCR – Polymerase Chain Reaction



PCR – Polymerase Chain Reaction

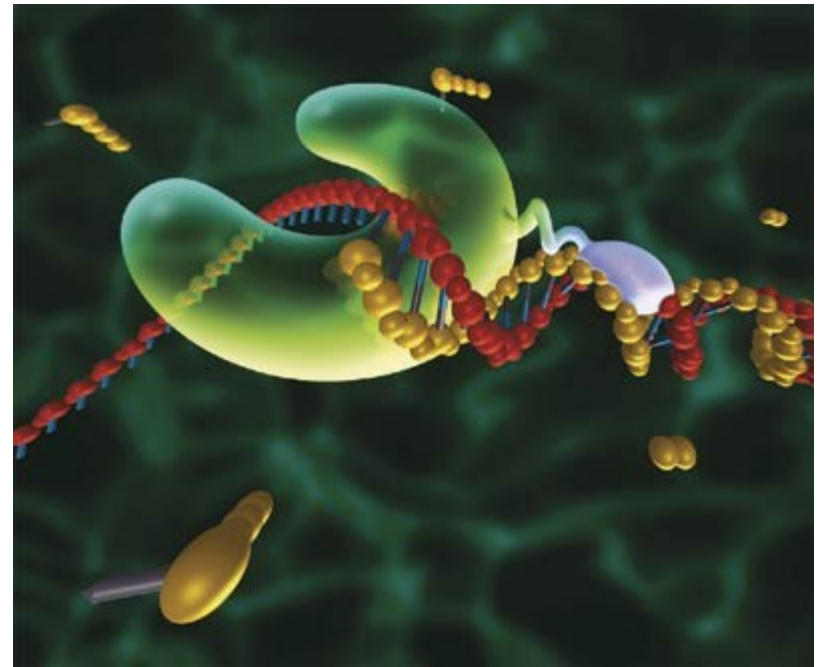
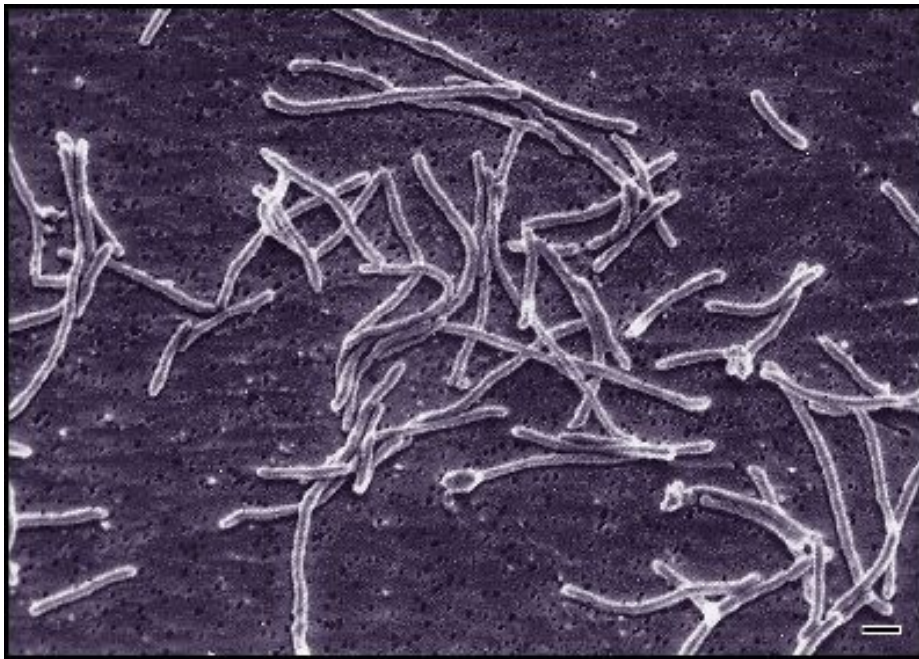


PCR – Polymerase Chain Reaction



PCR – Polymerase Chain Reaction

Pro rozvoj metody byl důležitý objev termostabilní polymerázy z termofilní bakterie *Thermus aquaticus* = zkratka **Taq Pol**" nebo "**Taq**")
- Nemá 3'-5' exonukleázovou aktivitu = neopravuje chyby v syntéze DNA (1 chyba na 4000-5000 bp) = nevhodné pokud plánujeme sekvenovat zaklonované PCR produkty



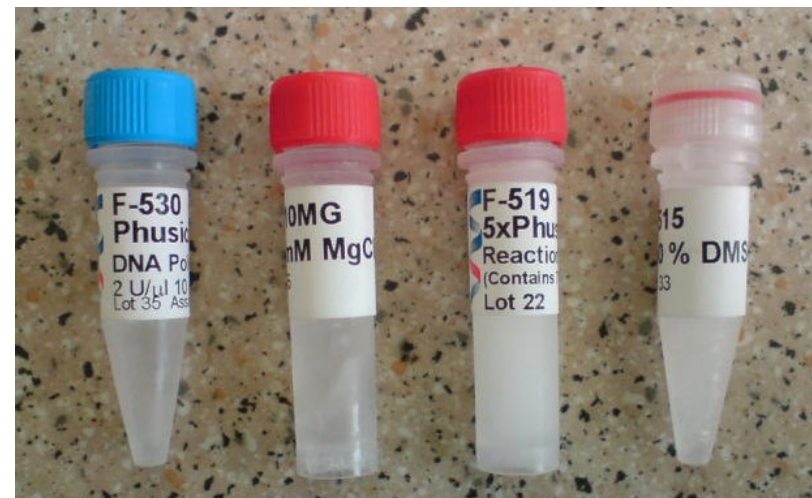
Unit-definition: One unit is defined as the amount of enzyme which will convert 10 nmoles of dNTPs to an acid-insoluble form in 30 min at 72°C under the assay conditions (25 mM TAPS (tris-(hydroxymethyl)-methyl-amino-propanesulfonic acid, sodium salt) pH 9.3 (25°C); 50 mM KCl; 2 mM MgCl₂; 1 mM b-mercaptoethanol; and activated calf thymus DNA as substrate.

PCR – Polymerase Chain Reaction

Další typy polymeráz

- Tth DNA polymeráza (*Thermus thermophilus*)
 - nemá exonukleázovou aktivitu
 - přítomnost Mn^{2+} iontů = reverzně transkripční aktivita (RT-PCR)
- Pfu, Pwo, DeepVent polymerázy (z pyrokoků)
 - mají 3' – 5' exonukleázovou aktivitu (2–6x nižší frekvence chyb)
 - degradují primery
- HotStar polymerázy
 - modifikované polymerázy
 - nebo jsou některé části reakční směsi odděleny od ostatních (vosk)
 - = pro začátek PCR je nutná vyšší denaturační teplota a delší čas denaturace

Polymerázy



Primery

GENERI BIOTECH

COMPOUNDS AND SERVICES FOR
MOLECULAR BIOLOGY



CENOVÝ REŽIM	CENA BEZ DPH	
	Běžný uživatel	<i>Zvýhodněný uživatel</i>
OLIGO BASIC (do 99 bází)	14,90 Kč / báze	13,90 Kč / báze
OLIGO 10+ (do 30 bází)	279 Kč / oligo	269 Kč / oligo
OLIGO 50+ (do 30 bází)	259 Kč / oligo	249 Kč / oligo
OLIGO 150+ (do 30 bází)	229 Kč / oligo	219 Kč / oligo

22										
23										
24	Number of Primers in Order 32									
25	Plate Well	Primer Sequence	Primer Name	Researcher Name	Scale	5'Modification	3'Modification	Purity	Special Handling	Bases
26	A1	CCATGGATCCTGTGTGAAGA	SML-001-F		50N			STD		20
27	A2	CACCATGTTCCACTTCCACTT	SML-001-R		50N			STD		21
28	A3	GTGATTGCATGCCAAATGAA	SML-002-F		50N			STD		20
29	A4	TTAGTAGCCCGCATGCTTTT	SML-002-R		50N			STD		20
30	A5	TCCCATGATGGAGAGACTCA	SML-013-F		50N			STD		20
31	A6	CCCAAAAGGGAATAGCAACC	SML-013-R		50N			STD		20
32	A7	TTGAGGAGGGCATTACGTC	SML-015-F		50N			STD		20
33	A8	GAGGCGTATCTCCAAGGTGT	SML-015-R		50N			STD		20

PCR na střední škole?



goTaq polymeráza fy PROMEGA
– 20ul (100U) = 650,- Kč



– dNTPs

– 1000ul

– 6 tis,- Kč

– PCR plast: cca 3 tis Kč

– 125 ks 8mi zkumavek ve „stripu“

– Pipeta á5–7 tisíc Kč

– 1–10ul + 10–100 ul + 100–1000 ul

– Agaróza: 8,5 tis Kč

– Cyclor: od cca 40 tisíc Kč

– personal cyclor 24 jamek

– kvalitnější, fast-ramping cyclery 200+

– elektroforéza se zdrojem: 20 tisíc Kč

For DNA/RNA electrophoresis Balení: 500g

Kód zboží: BIO-41025

Cena bez DPH: 7 000 Kč

Cena s DPH: 8 400 Kč



PCR na střední škole?

Speciální sady pipet



Plně autoklárovatelné, plynule nastavitelný objem, maximální přesnost a reproducibilita, ergonomický design, nastavitelný kónus koncovky kompatibilní s mnoha typy špiček.

Výrobce	Kat. číslo	Produkt	Popis	Cena (Kč)
Labnet	P3960-4	BioPette A4 Pack	4 pipety (0,5 – 10 µl, 2 – 20 µl, 20 – 200 µl, 100 – 1000 µl), stojan a špičky	10990,-
	P3960-6	BioPette A6 Pack	6 pipet (0,1 – 2 µl, 0,5 – 10 µl, 2 – 20 µl, 10 – 100 µl, 20 – 200 µl, 100 – 1000 µl), stojan a špičky	15990,-

GeneQ cyklér



Výrobce	Kat. číslo	Produkt	Max. rychlost ohřevu (°C / s)	Max. rychlost chlazení (°C / s)	Vnější rozměry š x h x v (mm)	Cena (Kč)
Bioer	TC-24/H(B) blok	GeneQ cyklér s blokem 24 x 0,2 ml	≥ 5	≥ 4	210 x 300 x 200	33300,-
	TC-18/H/(B) blok	GeneQ cyklér s blokem 18 x 0,5 ml	≥ 4	≥ 3	210 x 300 x 200	33300,-

PCR na střední škole?

Problémy

- finanční náročnost – chemikálie, vybavení
- toxicita některých chemikálií

Možná řešení

- spolupráce s VŠ
- zisk financí z grantů
- předváděcí modely přístrojů
- Použití netoxický barviček DNA
- použití kitů na separaci a vizualizaci DNA
- spíš výhledově s vývojem technologií a poklesem cen



GelRed + GelGreen

ultra citlivá, extrémně stabilní a ekologicky bezpečná fluorescenční interkalační barviva NK
cena za 0.5 ml : 3300,-Kč bez DPH

PCR na střední škole?

Lonza



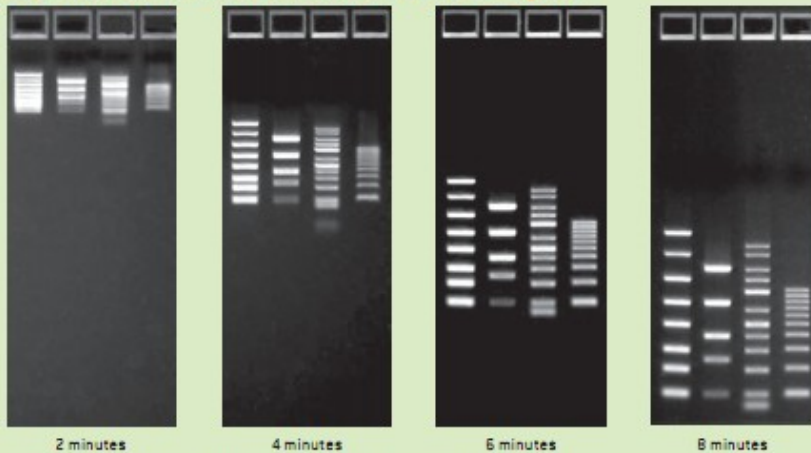
FlashGel® System

FlashGel® System



5 minute DNA separation

Separation at various run times on the FlashGel® System



Markers run on a 1.2% FlashGel® Cassette, 12+1 well format. 275 V for times as shown.

From left to right: FlashGel® DNA Marker 100 bp – 4 kb, FlashGel® QuantLadder, Lonza Marker 50 bp – 2,500 bp, Lonza 100 bp Ladder.

Modifikace PCR

Fast PCR

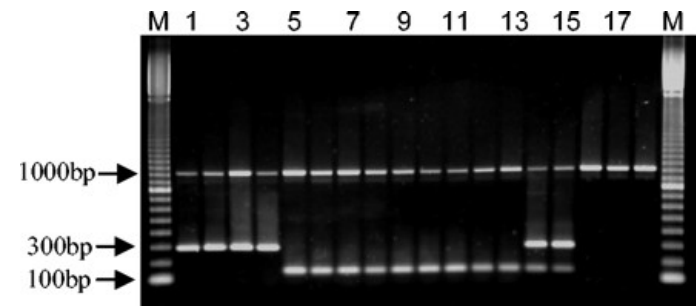
- PCR na speciálním cykleru (fast ramping = rychlá změna teplot)
- zkrácení doby PCR o 20–70%
- modifikované polymerázy – syntéza 1 kb/s
- (klasická *Taq* polymeráza 150 nt/s)

• Gradientová PCR

- Pro optimalizaci T_a (gradientový cykler)

• Multiplex PCR

- v PCR směsi vícero primerových párů
= např. amplifikace několika mikrosatelitních lokusů v jedné PCR



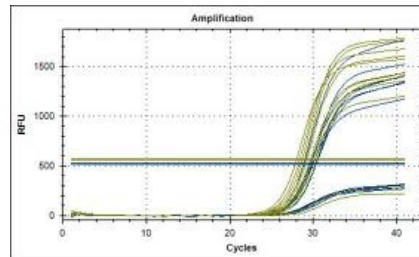
Modifikace PCR

RT-PCR

- Reverse transcription PCR (přepis RNA do DNA = cDNA)

Real time PCR, qPCR

- Založena na klasické PCR
- Kontinuální sledování PCR produktu během PCR reakce
- Detekce PCR produktu v exponenciální fázi PCR reakce, kdy je reakce precizní a specifická
- Fluorescenční barviva (SYBR Green, LC Green)
- Vysoká citlivost
- Finanční náročnost



Modifikace PCR

In Planta PCR

- technika umožňující např. detekci patogenních organismů v infikované rostlině, resp. z rostlinného extraktu
- použití vysoce specifických primerů např. pro určitý gen



Phytopathology

Editor-in-Chief: George W. Sundin
Published by The American Phytopathological Society

[Home](#) » [Phytopathology](#) » [Table of Contents](#) » [Abstract](#)

[Previous Article](#) | [Next Article](#)

February 2011, Volume 101, Number 2
Pages 250-262
<http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-07-10-0190>

Ecology and Epidemiology

In Planta and Soil Quantification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* and Evaluation of Fusarium Wilt Resistance in Chickpea with a Newly Developed Quantitative Polymerase Chain Reaction Assay

Daniel Jiménez-Fernández, Miguel Montes-Borrego, Rafael M. Jiménez-Díaz, Juan A. Navas-Cortés, and Blanca B. Landa

First and third authors: College of Agriculture and Forestry, University of Córdoba, Edificio C-4 'Celestino Mutis', Campus de Rabanales, Ctra. Madrid-Cádiz, km 396, 14071 Córdoba, Spain; and second, fourth, and fifth authors: Institute of Sustainable Agriculture (IAS), Spanish National Research Council (CSIC), Alameda del Obispo S/N, P.O. Box 4084, 14080 Córdoba, Spain.

[PDF Print \(571 KB\)](#) | [PDF with Links \(512 KB\)](#)

[Open Access.](#)

Fusarium wilt of chickpea caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* can be managed by risk assessment and use of resistant cultivars. A reliable method for the detection and quantification of *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* in soil and chickpea tissues would contribute much to implementation of those disease management strategies. In this study

Modifikace PCR

Direct PCR

- PCR bez přečištěné DNA
- výseky listů, semena, extrakty
- speciální PCR kity
- použití primerů pro určitý gen

- varianty: *Single cell/filament PCR*
- např. u špatně kultivovatelných mikroorganismů (sinice *Konvophoron*)

KAPA 3G Plant PCR Kits



Souprava umožňující amplifikaci DNA přímo z rostlinných tkání.

KAPA 3G Plant PCR Kit obsahuje zcela unikátní polymerázu 3. generace, která je tolerantní k většině polyfenolům a polysacharidům, nejběžnějším rostlinným inhibitorům PCR reakcí. Kit je optimalizován pro rychlou a efektivní amplifikaci DNA ze surových rostlinných tkání.

Klíčové vlastnosti:

- Rychlá PCR přímo z rostlinných tkání (listy, semena) i ze surových extraktů
- Zjednodušení pracovních postupů při screeningu transgenních organismů
- Vyšší reprodukovatelnost a úspěšnost PCR reakcí
- Efektivní amplifikace dlouhých a obtížných templátů ze všech typů vzorků

Název	Kat. č.	Balení	Cena bez DPH	DPH	
KAPA 3G Plant PCR Kits	KK7251	250	6 975,-	20 %	Objednat



AFLP

Princip

- metoda založená na restrikci DNA dvěma enzymy
- selektivní namnožení jen některých proužků
- vizualizace proužků na gelu

Postup – relativně složitý (4 fáze)

1. RESTRIKCE

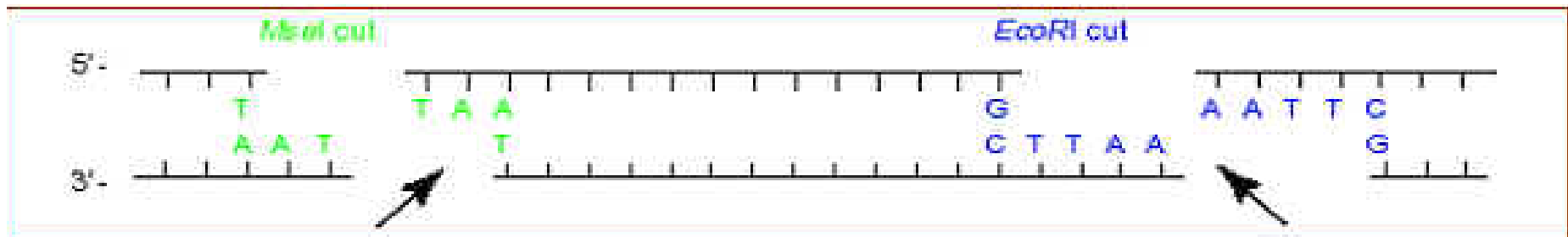
- specifické rozštěpení DNA restrikčními endonukleázami

MseI – rozpoznává 4bp dlouhou sekvenci (TTAA)

EcoRI – rozpoznává 6bp dlouhou sekvenci (GAATTC)

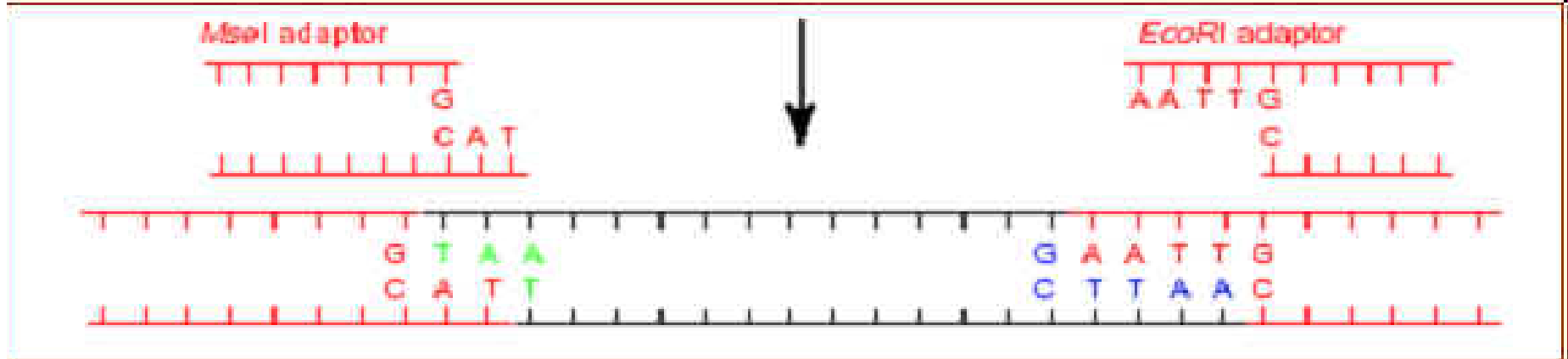
(Variabilita je dána mutací v restrikčním místě insercí – delecí mezi restrikčními místy)

- získáme množství fragmentů s „lepivými konci“ = „sticky ends“



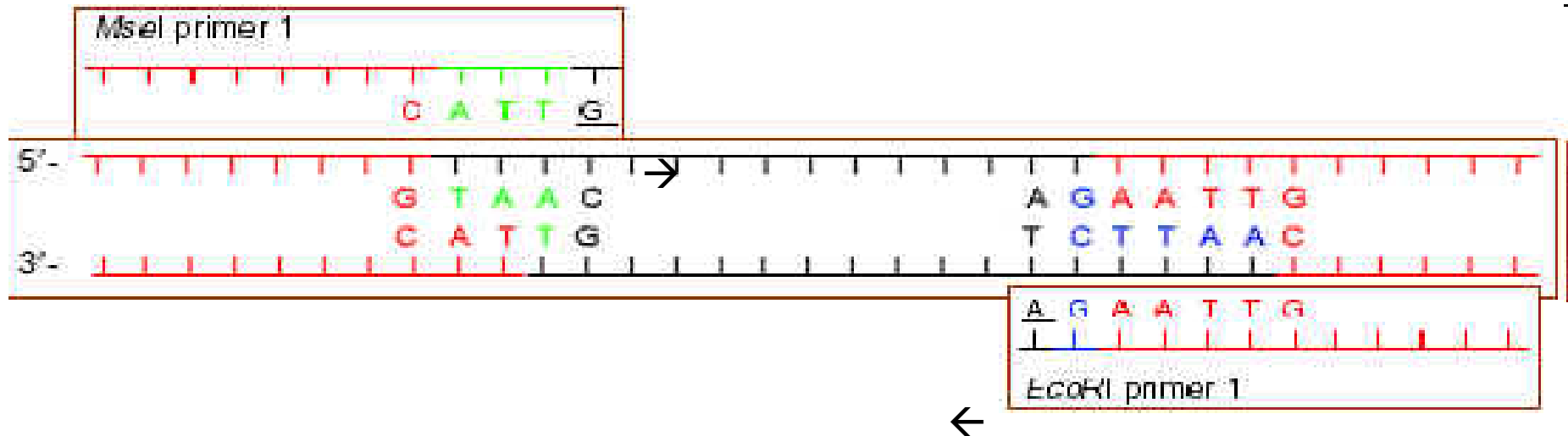
AFLP – 2. ligace

- pomocí T4 ligázy k fragmentům přidány adaptors = oligonukleotid, jeho sekvenci známe
- známe sekvence konců všech fragmentů ... můžeme je amplifikovat PCR



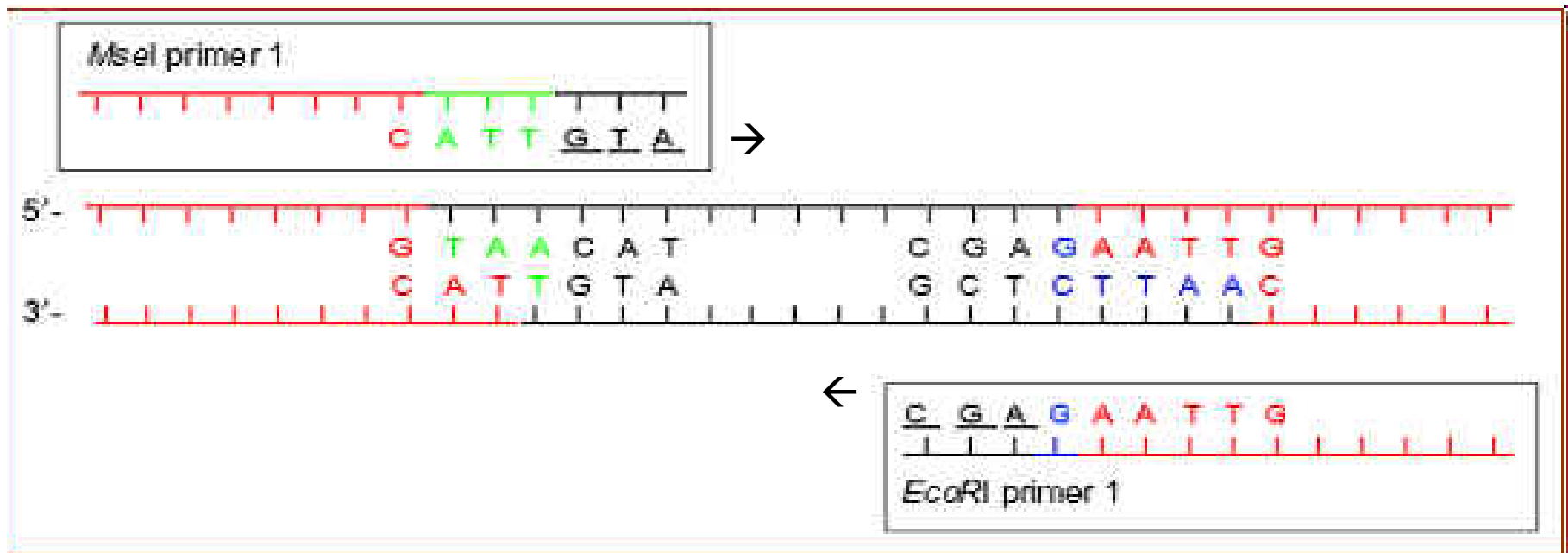
AFLP – 3. preselektivní amplifikace

→ klasická PCR s primery komplementárními k sekvenci adaptorů, navíc 1 nukleotid směrem dovnitř amplifikovaného úseku
= selekce jen ca. 1/4 fragmentů



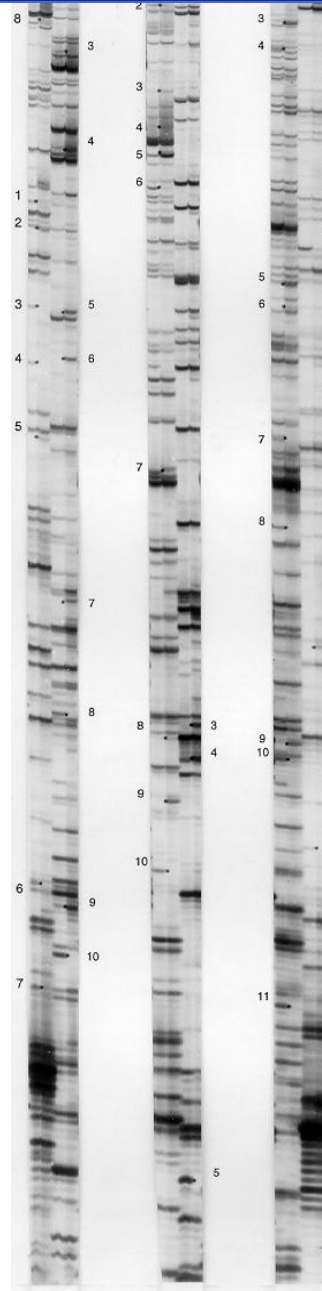
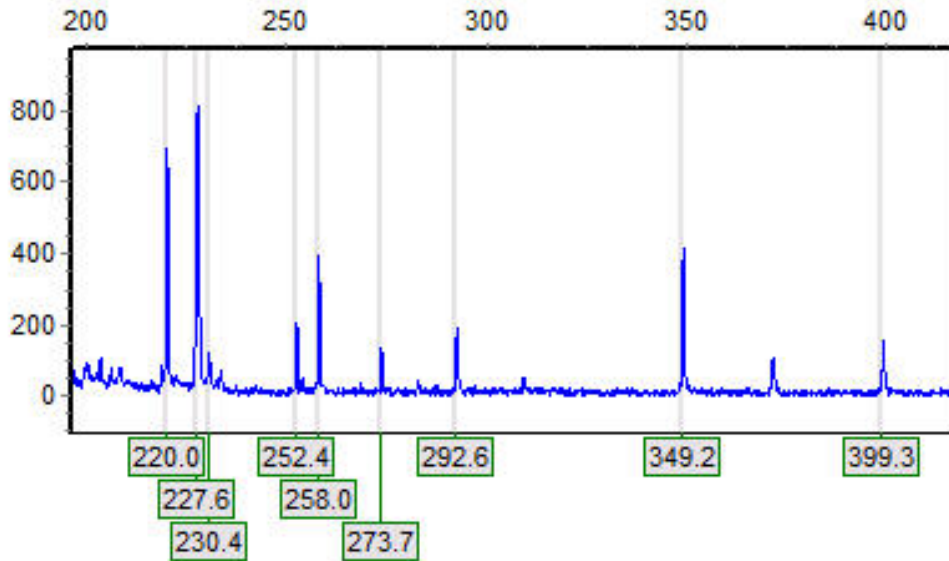
AFLP – 4. selektivní amplifikace

- fragmentů je stále mnoho pro objektivní vyhodnocení →
- další redukce jejich počtu použitím primerů se 3mi selektivní nukleotidy (s přesahem "dovnitř" amplifikovaných fragmentů)
- redukce na 1 / 256 všech fragmentů ($1 / 16 \times 1 / 16$)



AFLP – 5. vyhodnocení

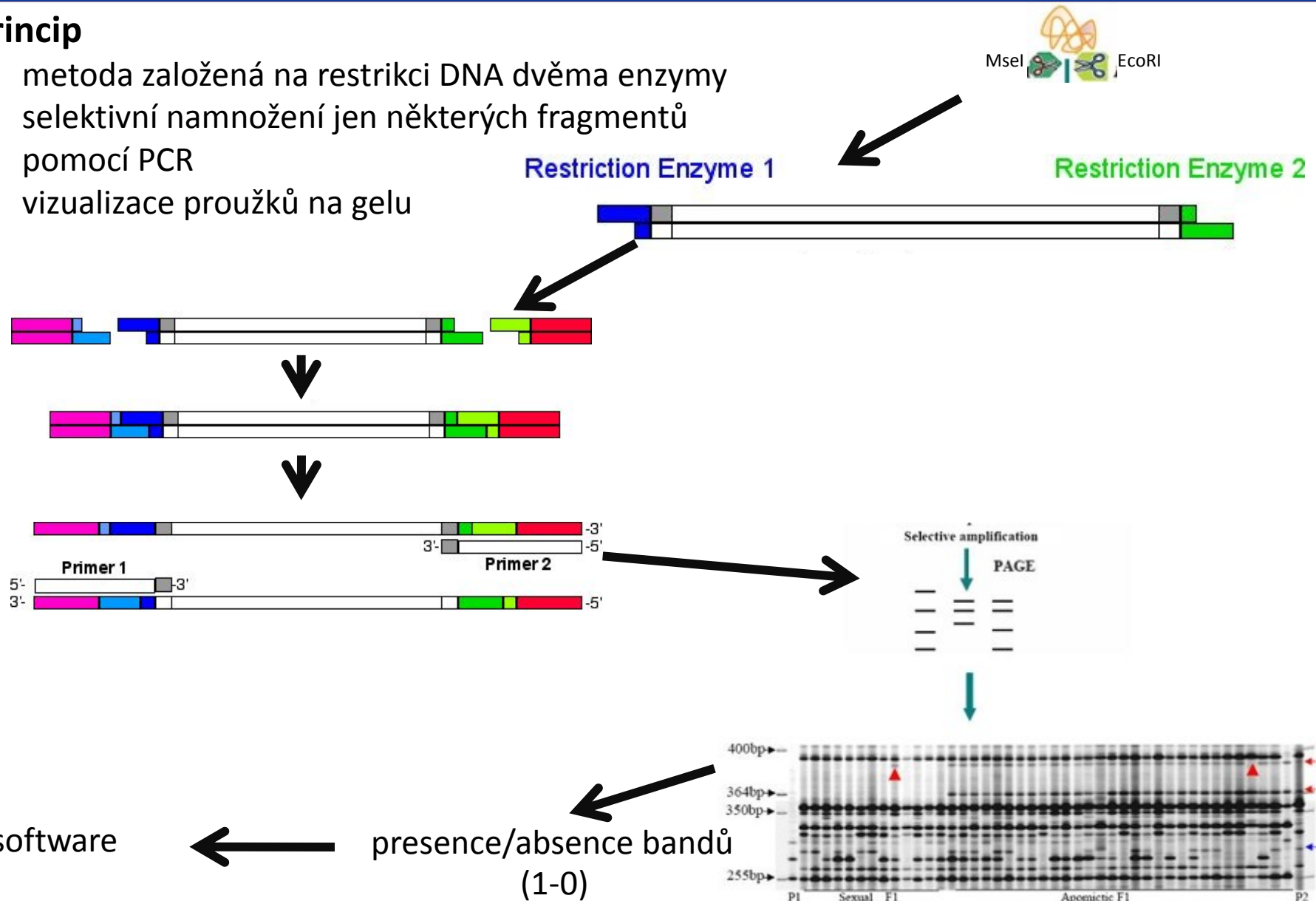
- primery jsou fluorescenčně značeny → sekvenátor
- Primery bez značení → PAGE elektroforéza



AFLP – princip metody v kostce

Princip

- metoda založená na restrikci DNA dvěma enzymy
- selektivní namnožení jen některých fragmentů pomocí PCR
- vizualizace proužků na gelu



AFLP – realizace



1: Restrikce

- příprava restrikčního mixu (EcoI, MseI, buffer, voda)
- přidat k DNA
- inkubovat 2 hod při 37°C

2: Ligace

- příprava ligačního mixu (LIGAZA, BUFF, ADAPTORY, VODA)
- přidat k roztoku z předchozího kroku
- inkubovat 2,5 hod při 37°C



3: Preamplifikace

- klasická PCR
- ligační roztok jako matrice

Kroky 1–3 se provedou pouze 1x, dál pracujeme s preamplifikátem

4: Amplifikace

- klasická PCR
- matrice = preamplifikát
- měníme kombinace primerů = detekujeme jiné fragmenty

Výhody

x

Nevýhody

- Rychlé získání polymorfismu
 - Proto relativně levná
 - Citlivá (na bodové mutace)
 - Velmi snadno opakovatelná
 - Celý genom
 - 50–100 fragmentů najednou
 - Není třeba znát sekvenci primeru
 - Pokud je metodika zavedená na pracovišti a máme DNA v dostatečné kvalitě – AFLP lze aplikovat na jakýkoliv organismus
- DOMINANTNÍ MARKER
 - Omezená hodnota získaných informací pro fylogenetické/evoluční, biosystematické apod. studie

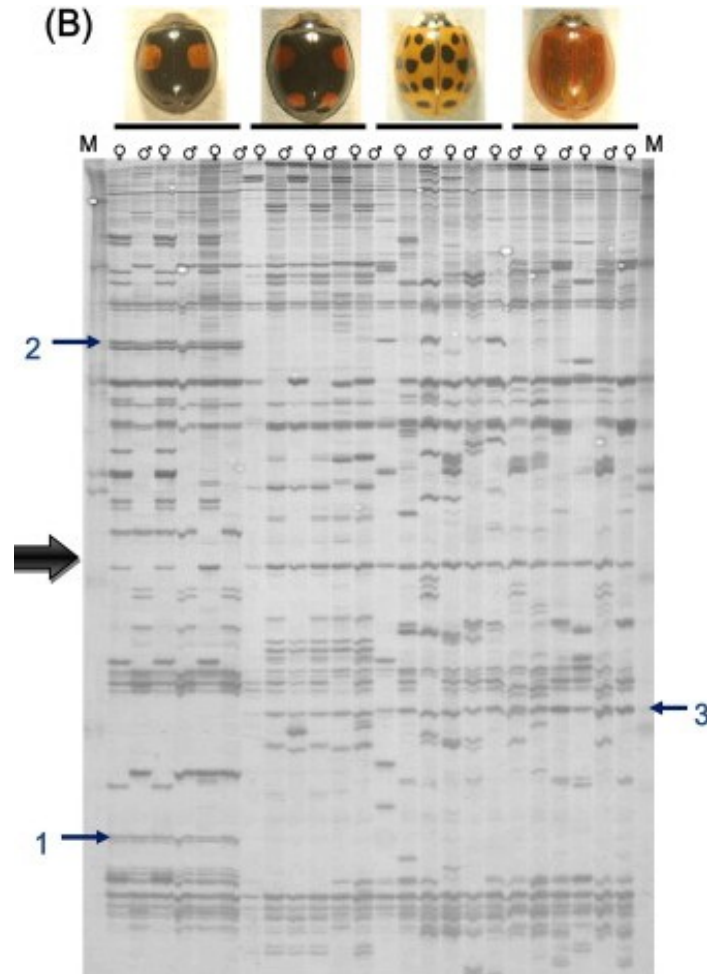
Příklad využití metody AFLP

AFLP bands for six additional individuals in the context of different regions and gender.

'1' indicates an AFLP marker that is specific for *Conspicua* individuals but absent for other color pattern individuals.

'2' is a newly depicted AFLP marker specific for the Conspicua color type.

'3' is a newly depicted AFLP marker specific for *Axyridis* but absent in the *Conspicua* color type.



Příklad využití metody AFLP

Studium genetické variability populací pelyňku Pančičova *Artemisia pancicii*

Rozšíření: Panonský endemit – vyskytuje se jen na několika lokalitách v srbské Vojvodině, panonské oblasti Rakouska a jižní Moravy.

Ekologie: Roste na stepních trávnicích, na výslunných svazích a lesostepních okrajích, v pásmu pahorkatin. Na jihomoravských lokalitách se udržuje vegetativně, kvete jen vzácně a nažky prakticky nikdy nedozrávají.

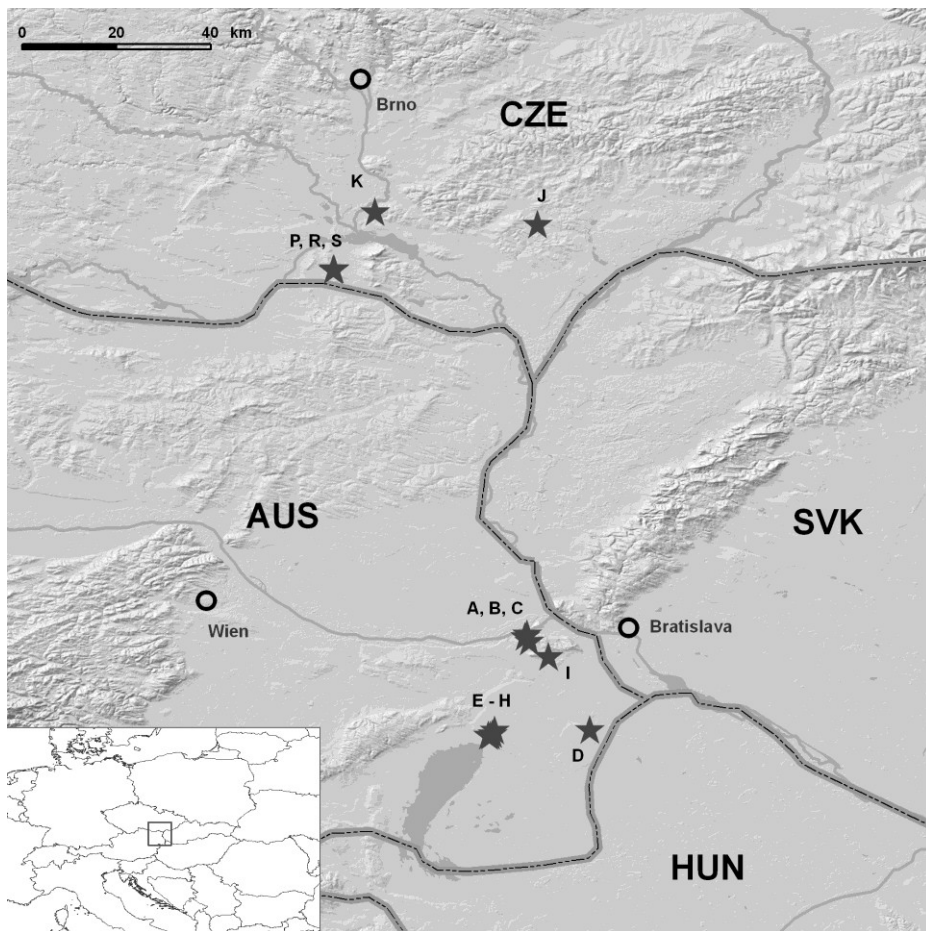


Je chráněn téměř všemi existujícími legislativními normami a ochranářskými úmluvami: u nás je zařazen ke kriticky ohroženým druhům (C1)

Je na „červeném seznamu“ Rakouska, zákonem chráněn v Srbsku Natura 2000: zařazen mezi prioritní druh

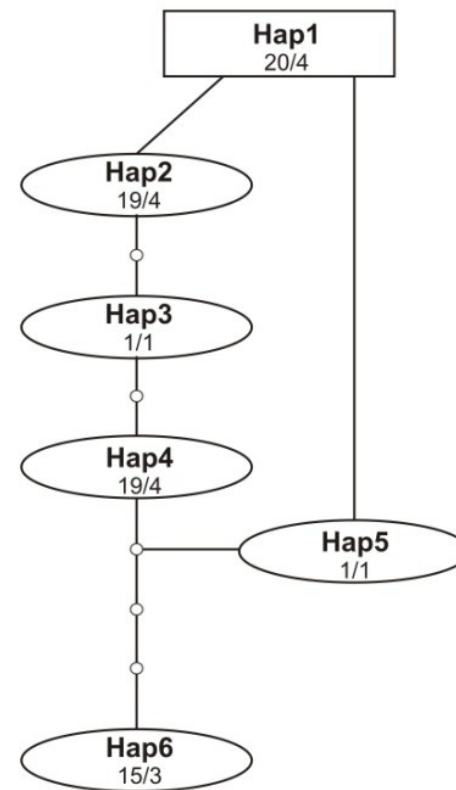
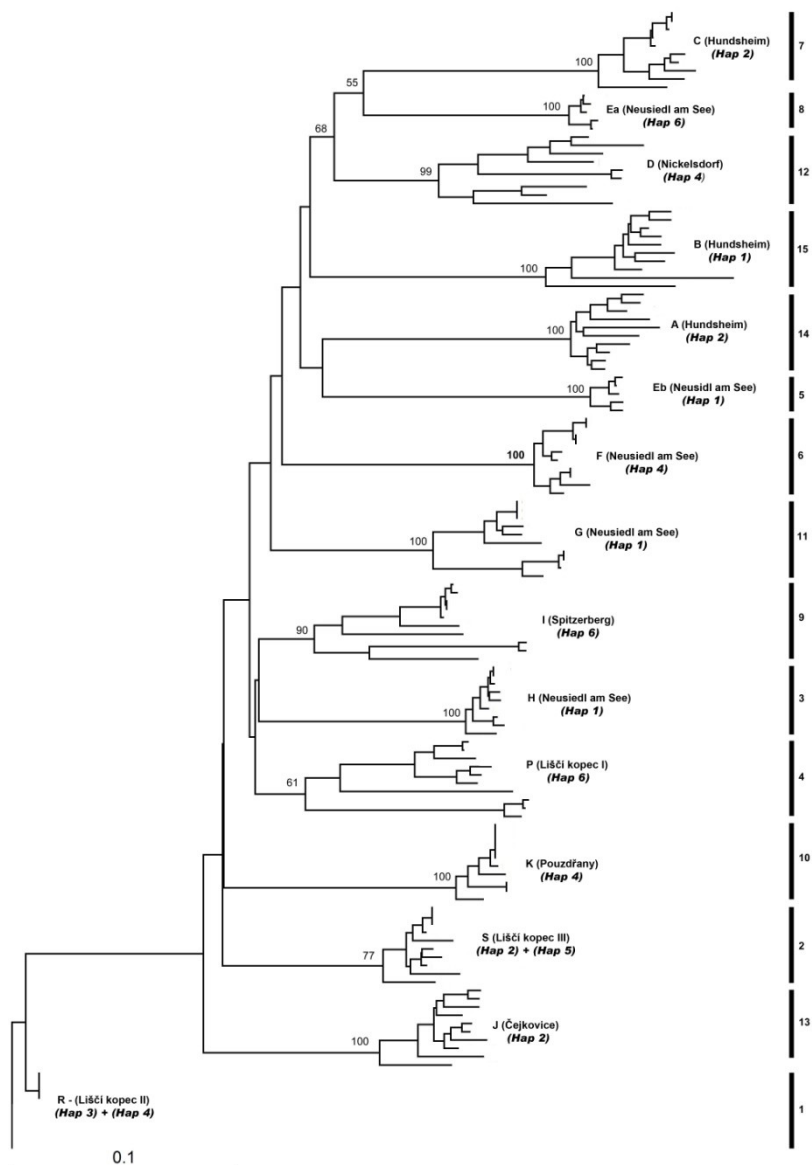
Je na seznamu přísně chráněných rostlin Úmluvy o ochraně evropské fauny a flóry a přírodních stanovišť Rady Evropy
Zapsán do celosvětového červeného seznamu ohrožených druhů rostlin.





<http://botany.cz/cs/artemisia-pancicii/>

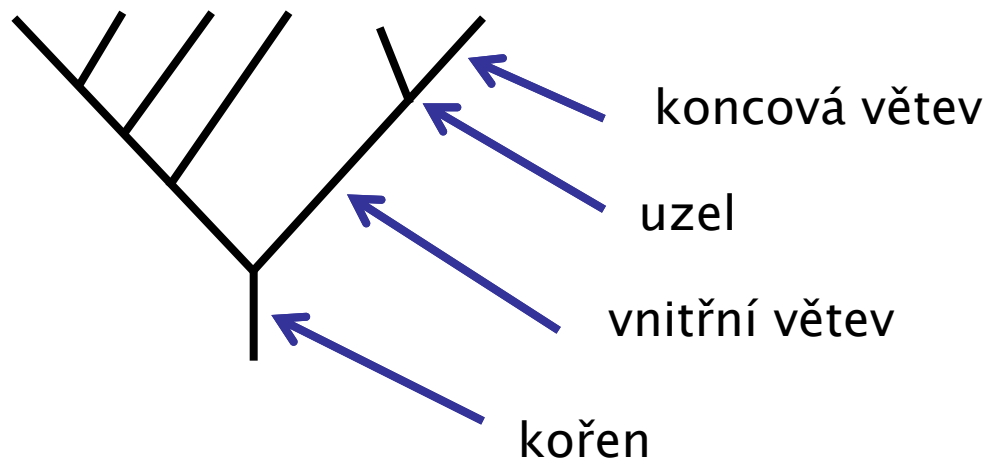
Kitner M., Majeský Ľ., Gillová L., Vymyslický T. & Nagler M. (2012): Genetic structure of *Artemisia pancicii* populations inferred from AFLP and cpDNA data. – Preslia 83: 97–120.



Kitner M., Majeský Ľ., Gillová L., Vymyslický T. & Nagler M. (2012): Genetic structure of *Artemisia pancicii* populations inferred from AFLP and cpDNA data. – Preslia 84: 97–120.

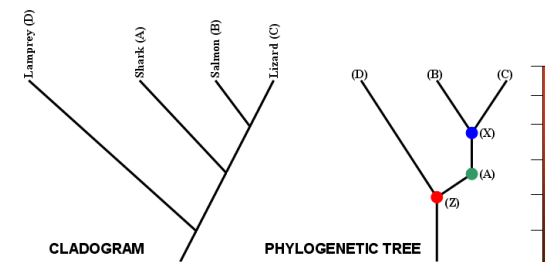
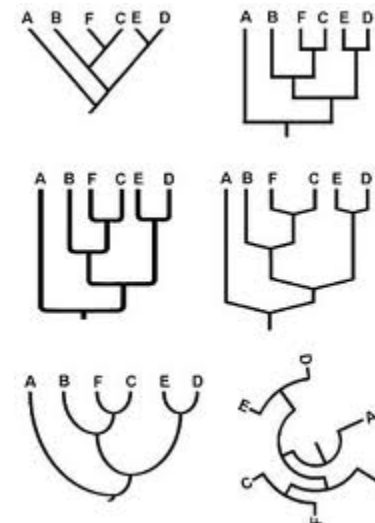
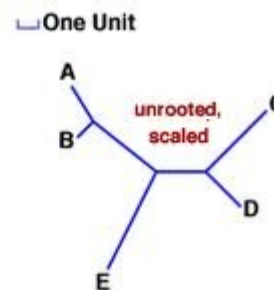
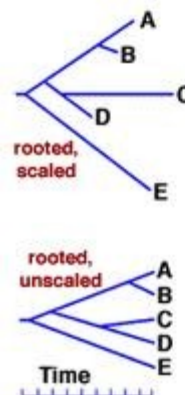
Fylogenetické stromy

Topologie



Různé typy

- zakořeněný, škálovaný
- nezakořeněný, škálovaný
- nezakořeněný, neškálovaný



A **cladogram** is a branched diagram that shows patterns of relatedness

Phylogenetic trees are branching diagrams – possibly a type of cladogram, depending on your view! – that represent possible evolutionary pathways

Metody tvorby fylogenetických stromů

	<u>typ dat</u>	
	vzdálenosti/podobnosti	DNA sekvence (nebo jiné znaky)
<u>zhlukovací</u> algoritmus	UPGMA Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean	
	neighbor-joining tree	
<u>optimalizační</u> kritérium	minimum evolution tree	maximum parsimony maximum likelihood Bayesova analýza

UPGMA – založena na předpokladu, že stromy jsou aditivní a všechny taxy jsou stejně vzdálené od kořene. Jedná se čistě o analýzu fenotypu, nebere v potaz např. rozdílnou délku evoluce.

neighbor-joining pracuje s kritériem minimální evoluce – hledá topologii s nejmenší celkovou délkou všech větví, tedy takovou, které odpovídá minimální počet evolučních změn.

minimum evolution – podobný princip jako NJ, vychází ze sekvenačních dat

maximum parsimony – nejvíce pravděpodobný strom je ten, který vyžaduje nejmenší počet evolučních změn k vysvětlení pozorovaných dat

maximum likelihood – prohledává všechny možné stromy a stanovuje pravděpodobnost, s jakou mohl evoluční scénář generovat soubory znaků, odpovídajících vloženým znakům

Indexy genetické podobnosti/vzdálenosti

(binární data)

		Individual <i>i</i>	
		Band presence 1	Band absence 0
Individual <i>j</i>	Band presence 1	<i>a</i>	<i>b</i>
	Band absence 0	<i>c</i>	<i>d</i>

where $n = a + b + c + d$

	A	B
a		
b		
c		
b		
d		



Jaccard coefficient (Jaccard 1908)

$$\frac{a}{a + b + c}$$

The Jaccard coefficient only takes into account the bands present in at least one of the two individuals, and is therefore unaffected by homoplastic absent bands (when the absence of the same band is due to different mutations).

Dice coefficient (Dice 1945)

The Dice coefficient is equivalent to the Nei and Li coefficient (Nei & Li 1979) and the Sørensen coefficient (Sørensen 1948).

$$\frac{2a}{2a + b + c}$$

Comparable to the Jaccard coefficient, the Dice coefficient gives more weight to the bands present in both individuals. It thus lays the emphasis on the similarity between individuals, rather than on their dissimilarity.

Simple-matching coefficient (Sokal & Michener 1958)

$$\frac{a + d}{a + b + c + d} = \frac{a + d}{n}$$

The simple-matching coefficient maximizes the amount of information drawn from an AFLP profile by considering all scored loci. Double-band absence and double band presence are given the same biological importance, which may not be adequate in case of frequent band absence homoplasy. This coefficient has interesting Euclidean metric properties that allow its use in an analysis of molecular variance (AMOVA; Excoffier *et al.* 1992).

Příklad konstrukce UPGMA dendrogramu

TABLE 27.9. Example of UPGMA tree construction

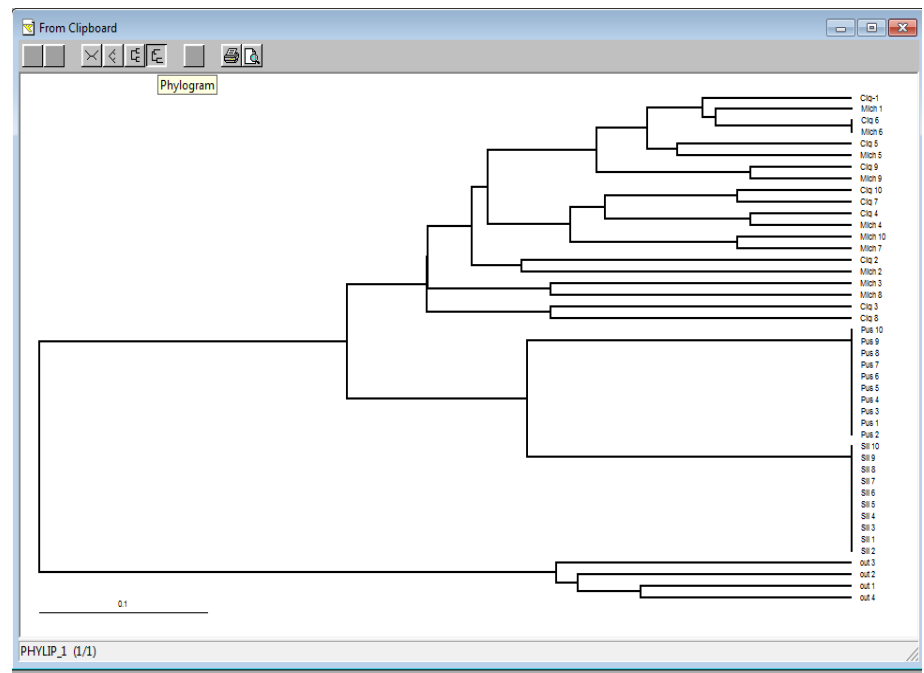
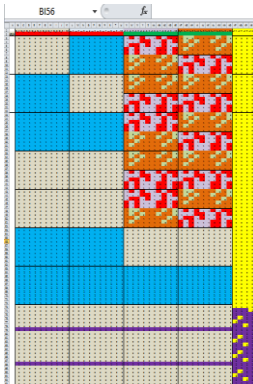
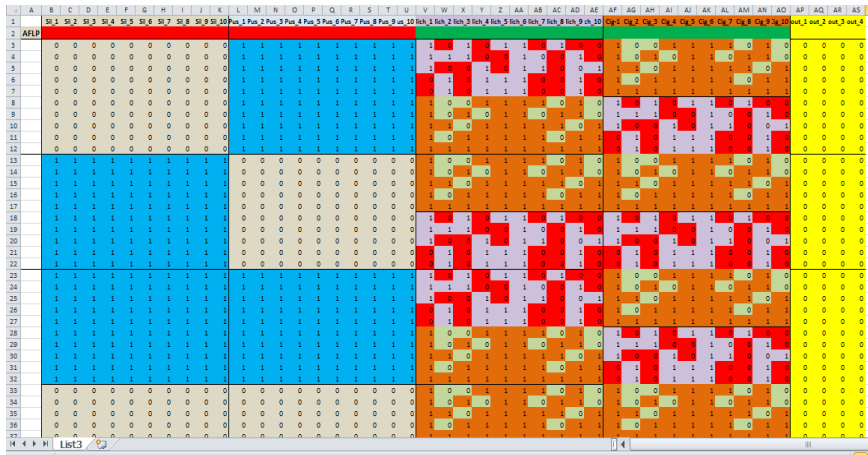
Step	Cycle 1	Cycle 2	Cycle 3	Cycle 4	Cycle 5	Cycle 6
Distance matrix	OTUs A B C D E B 2 C 4 4 D 6 6 6 E 6 6 6 4 F 8 8 8 8 8	OTUs AB C D E C 4 D 6 6 E 6 6 4 F 8 8 8 8	OTUs AB C DE C 4 DE 6 6 DE 8 8 8	OTUs ABC DE DE 6 F 8 8	OTUs ABCDE F 8	No new matrix
Identify smallest D	$A \leftrightarrow B = 2$	$AB \leftrightarrow C = 4$ $D \leftrightarrow E = 4$	$AB \leftrightarrow DE = 6$ $C \leftrightarrow DE = 6$	$ABC \leftrightarrow DE$	$ABCDE \leftrightarrow F$	
Taxa joined	A and B	D and E	AB and C	ABC and DE	ABCDE and F	
Subtree						
Comments on tree drawing	The distance between A and B is 2 units. A subtree is drawn with the branch point halfway between the two. Thus, each branch is 1 unit in length.	Branching done as in Step 1. Because the distance from AB to C is also 4, that pair could have been selected as well.	First a subtree is drawn with AB and C: The the AB subtree is attached to the AB branch at a point equal to the length of the A and B branches.	The tree is first done as in Step 3 with the ABC and DE subtrees replacing the branches.	The tree is now complete but unrooted.	The tree can then be rooted using midpoint rooting which tries to balance all the tips to reach the same end point. Note this is the tree that we started with to build the distance matrix.

From <http://www.icp.ucl.ac.be/~opperd/private/upgma.html>.

AFLP – využití ve výuce

Zadání úlohy pro studenta – viz. DOPLŇKOVÉ MATERIÁLY

- Podle níže uvedeného postupu vytvořte dendrogram pěti populací dvou blízce příbuzných rostlinných druhů
- Z výsledného dendrogramu zjistěte:
 - kolik populací má každý druh,
 - které populace jsou navzájem podobnější
 - jaký typ rozmnožování pravděpodobně převládá u jednotlivých populací



MIKROSATELITY

krátké tandemové repetice, STR (short tandem repeats)
repetice jednoduchých sekvencí, SSR (simple sequence repeats)

- krátké, tandemově se opakující jednoduché sekvenční motivy zpravidla o délce 2–6bp
- prokaryota a eukaryota
- kódující i nekódující oblasti
- hlavní zdroj vysoké proměnlivosti – sklouznutí nukleotidového řetězce během replikace (replication slippage)

...GTTCTGTCATATATATATATAT.....CGTACTT...

...GTTCTGTCATATATATATATATATATCGTACTT...

- Alely se liší svou délkou.....
- Snadná separace pomocí elektroforézy

MIKROSATELITY

– **Dokonalé = perfect repeats** (jeden nepřerušný motiv):

- Jednonukleotidové: ...AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA...
- Dinukleotidové: ...CACACACACACACACACA... = (CA)_n
- Trinukleotidové: ...CGTCGTCGTCGTCGTCGTCGT... = (CGT)_n
- Tetranukleotidové: ...CAGACAGACAGACAGACAGA... =(CAGA)_n
- Pentanukleotidové: ...AAATTAAATTAAATTAAATT... =(AAATT)_n
- Hexanukleotidové: ... CTTTAACTTTAACTTTAACTTTAA... =(CTTTAA)_n

– **Nedokonalé = imperfect repeats** (motiv je přerušen jedním nebo několika bazemi):

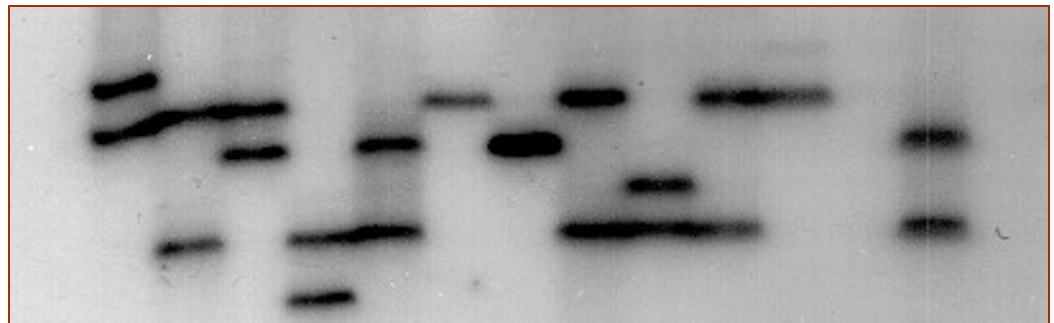
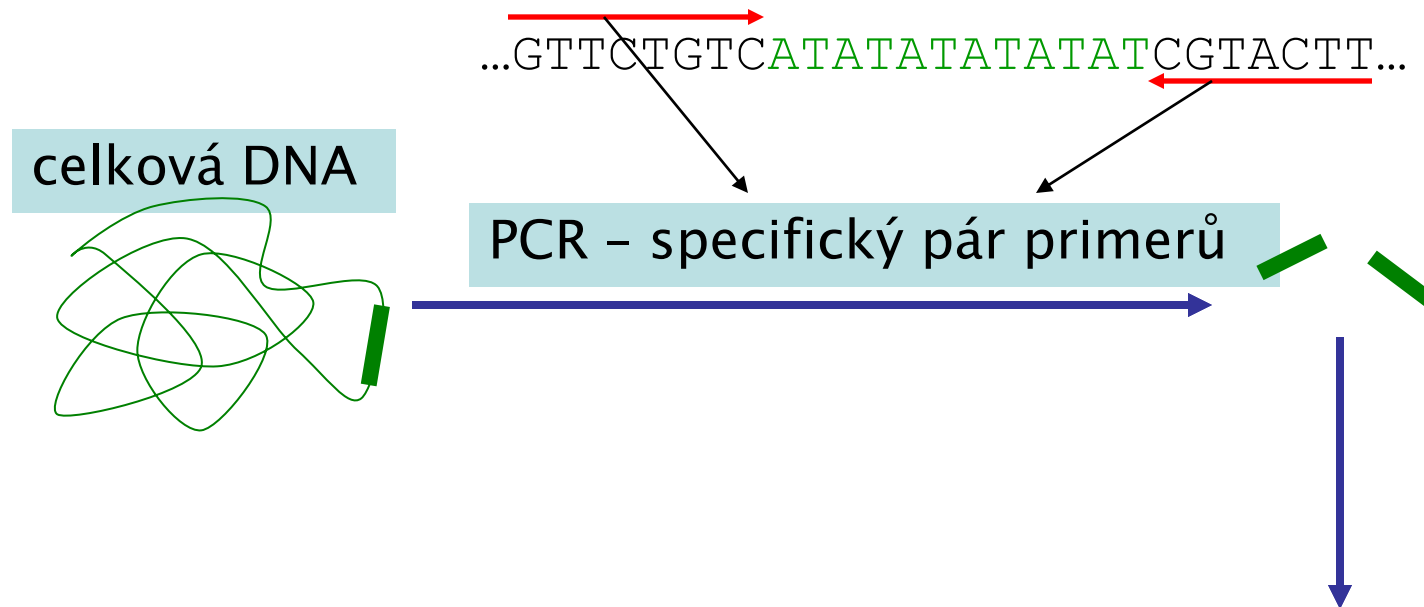
- ...(TC)₆A(TC)₁₃...; ...(AG)₁₂GG(AG)₃... *Cicer*

– **Složené = compound:** (směs dokonalých nebo nedokonalých vzorů několika motivů)

- ...(AT)₆(GT)₄₂AT(GT)₅(GT)₁₀...
- ...(AT)₁₄(AG)₈...
- ...(GAA)₂₁...(TA)₂₃

- **Nejčastější motivy:** mono a dinukleotidové; 3, 4 a 5ti méně

MIKROSATELITY



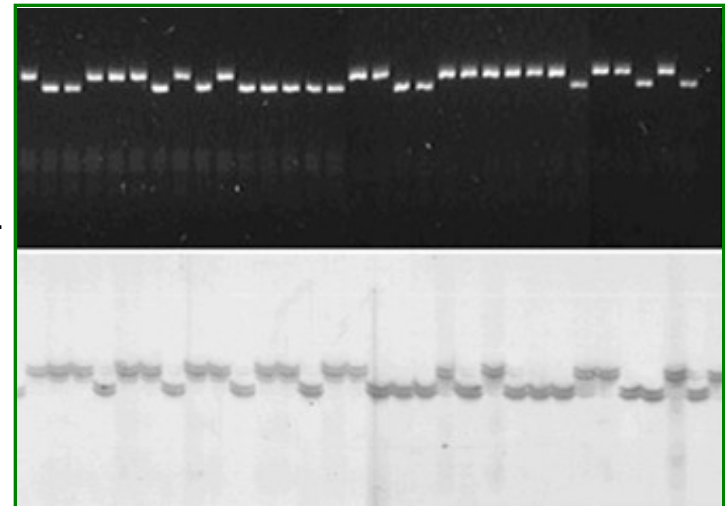
MIKROSATELITY

Výhody

- vysoká variabilita
- velká početnost a rozmístění po celém genomu
- jednoduchost analýzy (mikrosatelity lze poměrně snadno studovat pomocí PCR)
- robustní a reprodučibilní markery
- KODOMINANTNÍ MARKER, IDENTIFIKACE ALEL

Nevýhody

- Musíme znát sekvenční primery
- Pokud neznáme, tak testovat SSR z příbuzných druhů
- Optimalizace PCR
- Popřípadě vyvíjet nové: EST-SSR



MIKROSATELITY - využití

jaderné mikrosatelity (SSRs)

- nejlepší marker pro zhodnocení variability na populační úrovni
- jsou potřeba druhově specifické primery, tj. metoda použitelná pouze v případě, že pro studovaný druh byly primery již publikovány

chloroplastové mikrosatelity (cpDNA SSRs)

- vhodné pro hodnocení variability na úrovni příbuzných druhů, někdy i na vnitrodruhové úrovni
- dostupné jsou univerzální primery

Obecně:

- Forezní genetika: kriminalistika, identifikace jedinců, příbuzenské vztahy
- identifikace klonů
- populačně–genetické studie
 - genový tok, migrace
 - historie populací



MIKROSATELITY - využití



GENSERVICE, s.r.o.,

Zkušební laboratoř molekulární genetiky a cytogenetiky č. 1097, akreditovaná ČIA

Palackého 1 - 3, 612 42 Brno

IČO: 25326694 DIČ: CZ 25326694

Tel.: 541562186 Fax: 541562187

e-mail: genservice@volny.cz

www.almara.cz/genservice

ZKUŠEBNÍ PROTOKOL

Osvědčení o stanovení genetického typu psa

Č. protokolu: 8150/09

Strana: 1 z 1

Identifikace zvířete:

Jméno: Conny ze Psí Boudy

Tetovací číslo: 4771

Narození:

Plemeno: bernský salašnický pes

Pohlaví: pes

Laboratorní číslo: 973H/09

Datum příjmu biol. vzorku: 2.11.2009

Zkušební metoda: SOP I.

Ident. rodičů :

Otec: lab. číslo:

Matka: lab. číslo:

Č. zápisu v plemen knize: CMKU/BSP/4771/05/09

Zdroj DNA: bukalní stěr

Proveden: 17.11.2009

Vyšetřované lokusy	
PEZ 1	118 / 118
PEZ 3	123 / 129
PEZ 5	102 / 110
PEZ 6	188 / 196
PEZ 8	231 / 231
PEZ 12	300 / 304
PEZ 20	175 / 175
FHC 2010	223 / 227
FHC 2054	151 / 163
FHC 2079	269 / 277

Výsledek stanovení genetického typu - interpretace DNA testu: individuální DNA profil

Výsledky analýzy se vztahují ke zkoušenému vzorku. Protokol o analýze nesmí být bez písemného souhlasu laboratoře reprodučován jinak, než jako celek.

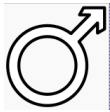
Zákazník - majitel výsledků: Kítner Milan, Protivanov 278, 798 48

V Brně, dne 19.11.2009

MVDr. Alena Hájková
vedoucí laboratoře



MIKROSATELITY - využití



Conny



Cassie



Clea

Vyšetřované lokusy	
PEZ 1	118 / 118
PEZ 3	123 / 129
PEZ 5	102 / 110
PEZ 6	188 / 196
PEZ 8	231 / 231
PEZ 12	300 / 304
PEZ 20	175 / 175
FHC 2010	223 / 227
FHC 2054	151 / 163
FHC 2079	269 / 277

+

Vyšetřované lokusy	
PEZ 1	118 / 118
PEZ 3	123 / 129
PEZ 5	102 / 102
PEZ 6	180 / 180
PEZ 8	231 / 231
PEZ 12	264 / 276
PEZ 20	175 / 175
FHC 2010	227 / 227
FHC 2054	155 / 155
FHC 2079	269 / 277

=

Vyšetřované lokusy	
PEZ 1	118 / 118
PEZ 3	129 / 129
PEZ 5	102 / 102
PEZ 6	180 / 188
PEZ 8	231 / 231
PEZ 12	276 / 300
PEZ 20	175 / 175
FHC 2010	227 / 227
FHC 2054	151 / 155
FHC 2079	269 / 269



MIKROSATELITY – využití ve výuce

Vyšetřované lokusy	otec1	otec2	matka	potomek 1	potomek 2
PEZ 1	118 / 118	118 / 118	118 / 118	118 / 118	118 / 118
PEZ 3	123 / 129	129 / 129	123 / 129	129 / 129	129 / 129
PEZ 5	102 / 110	102 / 102	102 / 102	102 / 102	102 / 102
PEZ 6	188 / 196	188 / 184	180 / 180	180 / 188	180 / 196
PEZ 8	231 / 231	227 / 231	231 / 231	231 / 231	231 / 231
PEZ 12	300 / 304	276 / 300	264 / 276	276 / 300	276 / 304
PEZ 20	175 / 175	175 / 175	175 / 175	175 / 175	175 / 175
FHC 2010	223 / 227	227 / 235	227 / 227	227 / 227	227 / 227
FHC 2054	151 / 163	155 / 163	155 / 155	155 / 163	151 / 155
FHC 2079	269 / 277	269 / 269	269 / 277	269 / 269	277 / 277

Zadání: rozhodněte kdo je biologickým otcem jedinců **potomek 1** a **potomek 2**.

MIKROSATELITY – využití ve výuce

Vyšetřované lokusy	otec1	otec2	matka	potomek 1	potomek 2
PEZ 1	118 / 118	118 / 118	118 / 118	118 / 118	118 / 118
PEZ 3	123 / <u>129</u>	<u>129</u> / <u>129</u>	123 / <u>129</u>	129 / <u>129</u>	129 / 129
PEZ 5	<u>102</u> / 110	<u>102</u> / <u>102</u>	<u>102</u> / <u>102</u>	102 / <u>102</u>	102 / 102
PEZ 6	<u>188</u> / 196	<u>188</u> / 184	180 / 180	180 / <u>188</u>	180 / 196
PEZ 8	231 / <u>231</u>	227 / <u>231</u>	231 / 231	231 / <u>231</u>	231 / 231
PEZ 12	<u>300</u> / 304	276 / <u>300</u>	264 / 276	276 / <u>300</u>	276 / 304
PEZ 20	175 / 175	175 / 175	175 / 175	175 / 175	175 / 175
FHC 2010	223 / <u>227</u>	<u>227</u> / 235	227 / 227	227 / <u>227</u>	227 / 227
FHC 2054	151 / <u>163</u>	155 / <u>163</u>	155 / 155	155 / <u>163</u>	151 / 155
FHC 2079	<u>269</u> / 277	<u>269</u> / 269	269 / 277	269 / <u>269</u>	277 / 277

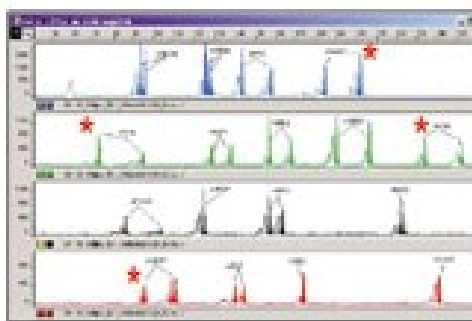
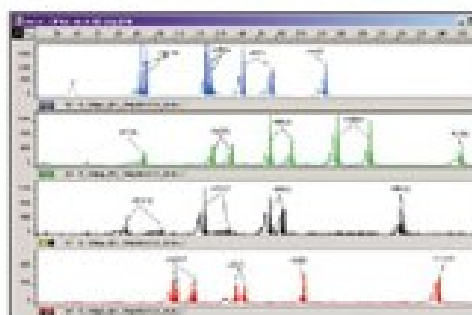
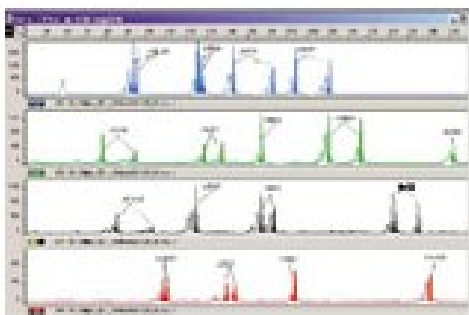
Závěr: nelze rozhodnout, kdo byl biologickým otcem jedince „potomek 1“

MIKROSATELITY – využití ve výuce

Vyšetřované lokusy	otec1	otec2	matka	potomek 1	potomek 2
PEZ 1	118 / 118	118 / 118	118 / 118	118 / 118	118 / 118
PEZ 3	123 / <u>129</u>	<u>129</u> / 129	123 / <u>129</u>	129 / <u>129</u>	129 / 129
PEZ 5	<u>102</u> / 110	<u>102</u> / 102	<u>102</u> / 102	102 / <u>102</u>	102 / 102
PEZ 6	188 / <u>196</u>	188 / 184	180 / 180	180 / <u>188</u>	180 / <u>196</u>
PEZ 8	231 / <u>231</u>	227 / <u>231</u>	231 / 231	231 / <u>231</u>	231 / 231
PEZ 12	300 / <u>304</u>	276 / 300	264 / 276	276 / <u>300</u>	276 / <u>304</u>
PEZ 20	175 / 175	175 / 175	175 / 175	175 / 175	175 / 175
FHC 2010	223 / <u>227</u>	<u>227</u> / 235	227 / 227	227 / <u>227</u>	227 / 227
FHC 2054	<u>151</u> / 163	155 / 163	155 / 155	155 / <u>163</u>	<u>151</u> / 155
FHC 2079	269 / <u>277</u>	269 / 269	269 / 277	269 / <u>269</u>	277 / <u>277</u>

Závěr: „Otec 1“ je biologickým otce jedince „**potomek 2**“.

MIKROSATELITY - využití



Departamento de Genética, Facultad de Ciencias Biológicas,
 Universidad Complutense de Madrid,
 C/ José Antonio Nováis 2, 28040 Madrid, España.
 Tel.: 91 3944855-4999 Fax.: 91 3944844

NOMBRE DEL PRODUJO		SEXO	RAZA	Edad
XXXX		M F	XXXX	XXXX
FECHA DE NACIMIENTO	MICROCHIP		PROPIETARIO / HERRERO	
XXXX	XXXX		XXXX	
NOMBRE DEL PADRE		NOMBRE DE LA MADRE		
XXXX		XXXX		

	PADRE	HIJO	IP
VHL20	85.1	85.1	
HTG4	123.1	123.1	
AHT4	147.1	147.1	
HMS7	187.1	187.1	
HTG6	103.1	103.1	
AHT5	132.1	132.1	
HMS6	167.1	167.1	
ASB23	212.1	212.1	
ASB2	236.1	236.1	
HTG10	84.1	84.1	
HTG7	121.1	121.1	
HMS3	148.1	148.1	
HMS2	234.1	234.1	
ASB17	108.1	108.1	
LEX3	103.1	103.1	
HMS1	177.1	177.1	
CA425	248.1	248.1	
IP COMBINADO			
PROBABILIDAD DE PATERNIDAD POSITIVA			0

	MADRE	HIJO	IP
VHL20	85.1	85.1	19.10077
HTG4	123.1	123.1	0.94019
AHT4	147.1	147.1	19.80794
HMS7	187.1	187.1	19.80794
HTG6	103.1	103.1	1.88887
AHT5	132.1	132.1	0.57471
HMS6	167.1	167.1	0.88887
ASB23	212.1	212.1	2.77778
ASB2	236.1	236.1	0.81728
HTG10	84.1	84.1	0.75758
HTG7	121.1	121.1	7.46288
HMS3	148.1	148.1	0.57471
HMS2	234.1	234.1	0.50000
ASB17	108.1	108.1	1.58787
LEX3	103.1	103.1	1.43448
HMS1	177.1	177.1	1.52341
CA425	248.1	248.1	2.50000
IP COMBINADO			0.00761
PROBABILIDAD DE PATERNIDAD POSITIVA			99.99999

Resumen y observaciones:

Fecha: _____ Firma: _____

MIKROSATELITY - využití

Investigator™ Human Identification PCR Kits

The QIAGEN® portfolio of multiplex PCR human identification kits offers the most comprehensive and versatile coverage of current STR standards, including the new extended European Standard Set (ESS), Combined DNA Index (CODIS), German DNA database (DAD), and Interpol Standard Set of Loci (ISSOL) requirements. The following tables summarize the kit markers by standard and by dye color.

Table 1. Markers of Investigator Human Identification PCR Kits by international standard

[illegible]

* Distributed worldwide, except in Australia, Canada, South Korea, and USA.

[†] Distributed worldwide, except in Australia, Brazil, Canada, China, South Korea, USA, and Japan.

^a Distributed worldwide, except in South Korea and USA.



MIKROSATELITY - využití

Table 3. X-chromosomal STR markers of the Investigator Argus X-12 Kit by dye color

Locus	Chromosomal mapping	Label dye
Amelogenin	Xp22.1-22.3, Yp11.2	6-FAM
DXS7132	Xq11.2	6-FAM
DXS7423	Xq28	BTY
DXS8378	Xp22.31	6-FAM
DXS10074	Xq12	BTG
DXS10079	Xq12	BTY
DXS10101	Xq26.2	BTG
DXS10103	Xq26.2	6-FAM
DXS10134	Xq28	6-FAM
DXS10135	Xp22.31	BTG
DXS10146	Xq28	BTY
DXS10148	Xp22.31	BTR
HPRTB	Xq26.2	BTR

* Distributed worldwide, except in Australia, Canada, South Korea, and USA.

Table 4. Y-chromosomal STR markers of the Investigator Argus Y-12 QS Kit by dye color

Locus	Chromosomal mapping	Label dye
Quality Sensor	—	6-FAM
DYS19	Yp11.2	BTG
DYS385	Yq11.222	6-FAM
DYS389-I	Yq11.21	BTG
DYS389-II	Yq11.21	BTG
DYS390	Yq11.221	6-FAM
DYS391	Yq11.21	BTG
DYS392	Yq11.222	BTY
DYS393	Yp11.31	BTY
DYS437	Yq11.21	6-FAM
DYS438	Yq11.21	BTY
DYS439	Yq11.21	6-FAM

* Distributed worldwide, except in Australia, Canada, South Korea, and USA.

SEKVENOVÁNÍ DNA

Zjištění pořadí nukleotidů v řetězci DNA

...ATATATAGGCAAGGAATCTCTATTATTAAATCATT...

Aplikace

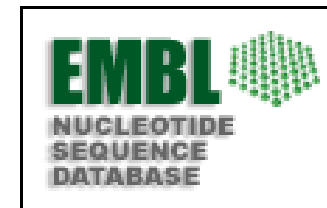
– Aplikační možnosti:

1. **evoluce genů** (vznik alel, lokusů, redukce polymorfismu v důsledku selekce atd.)
2. **vnitrodruhové (populační) studie** (geografická proměnlivost, tok genů, hybridizace, fylogeografie (př. mitochondriální geny, Y chromozom)
3. **mezidruhové studie** (studium speciace, biogeografie)
 - volba správné sekvence
4. **Detekce SNP** = identifikace jedinců, taxonů, populací – sekvenace pomáhá nalézt drobné populačně- i taxonově-specifické rozdíly

Výhoda

- Možnost srovnání sekvenčních dat o vašem organismu s údaji v internetových databázích

Př: <http://www.ebi.ac.uk/embl/>



SEKVENOVÁNÍ DNA – princip

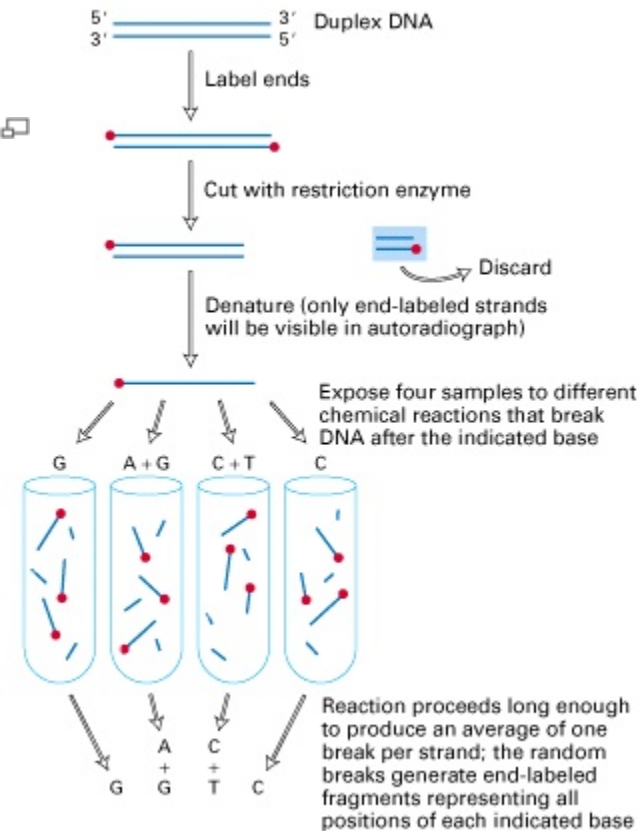
- 1) Předstupeň: PCR s použitím dvojice primerů
 - namnožení studovaného úseku DNA
- 2) sekvenační reakce
 - použití pouze jednoho primeru
 - produkce fragmentů lišících se přesně o 1 bázi
- 3) Elektroforetická separace fragmentů na gelu

SEKVENOVÁNÍ DNA

1977: dvě metody zjištění pořadí nukleotidů v DNA

Maxamova–Gilbertova (chemická) metoda

je založena na báze-specifické chemické modifikaci a následném štěpení fragmentů DNA – **dnes se neužívá**



Krátká sekvence DNA (ds nebo ss)

* na 5' konci radioaktivně označena ^{32}P . *

vzorek se rozdělí na čtyři části

a) Přídavek chemikáli – modifikují vždy jeden nebo dva typy nukleotidů:

1. dimethylsulfát: G

2. kys. mravenčí: A+G

3. hydrazin: C + T

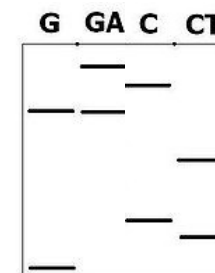
4. 1,5M NaCl: C

b) Přídavkem piperidinu: štěpení DNA v místě modifikace

c) Elfo separace

Výsledek ELFO:

sekvence DNA: 5'-GTCTGCA-3'
(čte se zespodu)

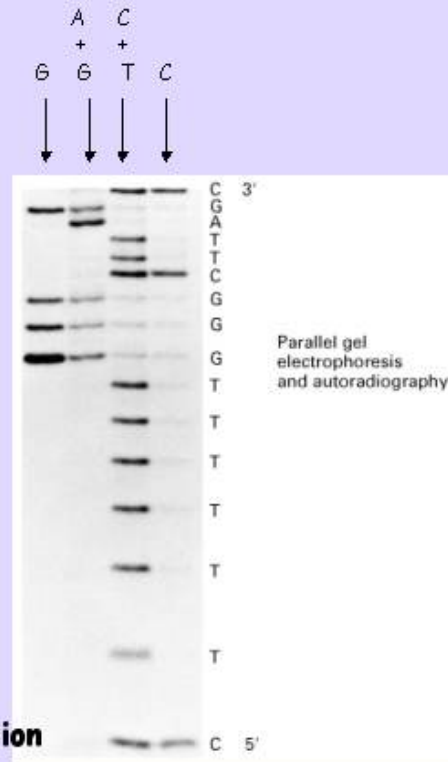


SEKVENOVÁNÍ DNA – Maxam-Gilbertova metoda

Maxamova–Gilbertova (chemická) metoda

- Each reaction is run in an adjacent lane of the gel
- After electrophoresis the gel is removed, dried and exposed to X-ray film
- Film is blackened where the DNA fragments have migrated
- The sequence is read from the bottom of the gel (shorter fragments) to the top of the gel (longer fragments).

This is the 5' to 3' direction



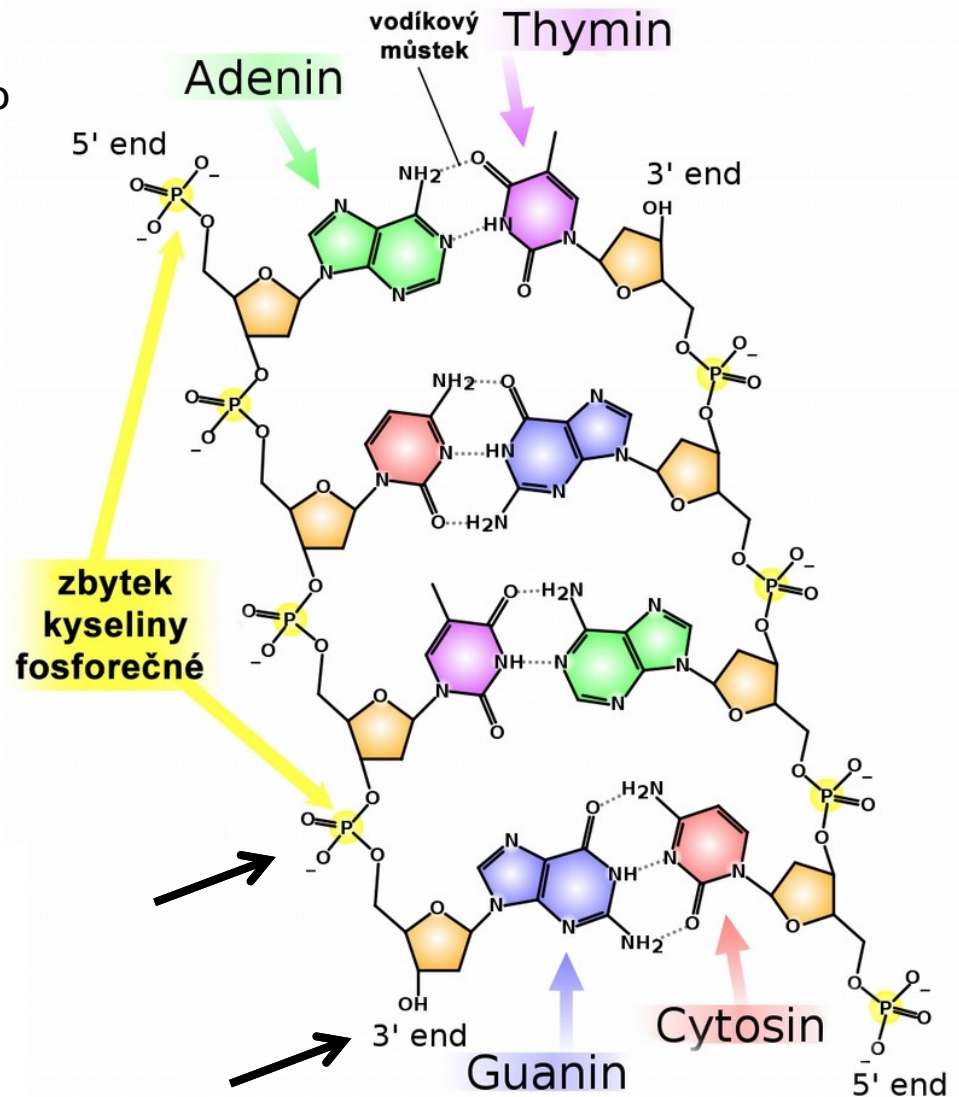
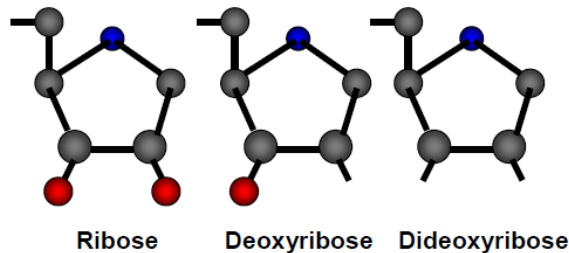
- Původně byla preferovaná před Sangerovou metodou
- vstup: pouze purifikovaná DNA, bez klonování (Sanger)
 - narazila na technické problémy s vývojem standartních molekulárních kitů (technicky příliš komplexní)
 - příliš mnoho toxických látek

SEKVENOVÁNÍ DNA

Sangerova metoda terminace řetězce

Sangerova metoda

- založena na terminaci replikace nového řetězce podle matrice zkoumané sekvence dideoxynukleozidtrifosfátem (ddNTP)
- na 3'-uhlíku deoxyribózy chybí OH-skupina a proto k nim DNA polymeráza nemůže navázat další nukleotid
- pokud během replikace dojde k náhodné inkorporaci dideoxynukleotidu (ddA, ddC, ddG, ddT), replikace se zde zastaví



SEKVENOVÁNÍ DNA

Sangerova metoda založená na terminace řetězce

Sangerova (enzymatická) metoda

- Vzorek DNA se rozdělí do čtyř zkumavek a do každé se přidá specifický primer, směs všech čtyř standartních nukleotidů a DNA polymeráza

- Do každého ze vzorků je přidán vždy jen jeden značený dideoxynukleotid – v určitém poměru s deoxinukleotidy

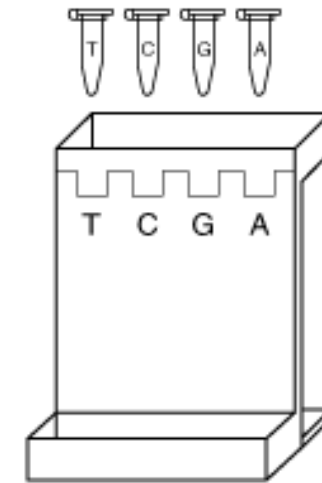
- Př:

- ddA + dA, dG, dC, dT
- ddT + dA, dG, dC, dT....

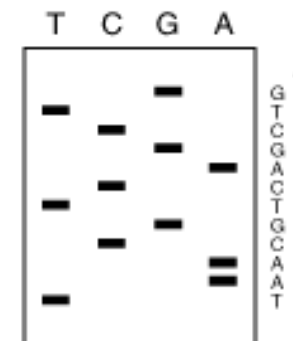
- Po ukončení amplifikace separace pomocí denaturující PAGE v dlouhém (sekvenačním) gelu + detekce autoradiograficky

- výsledné pořadí nukleotidů se odečte

1. Sequencing reactions loaded onto polyacrylamide gel for fragment separation



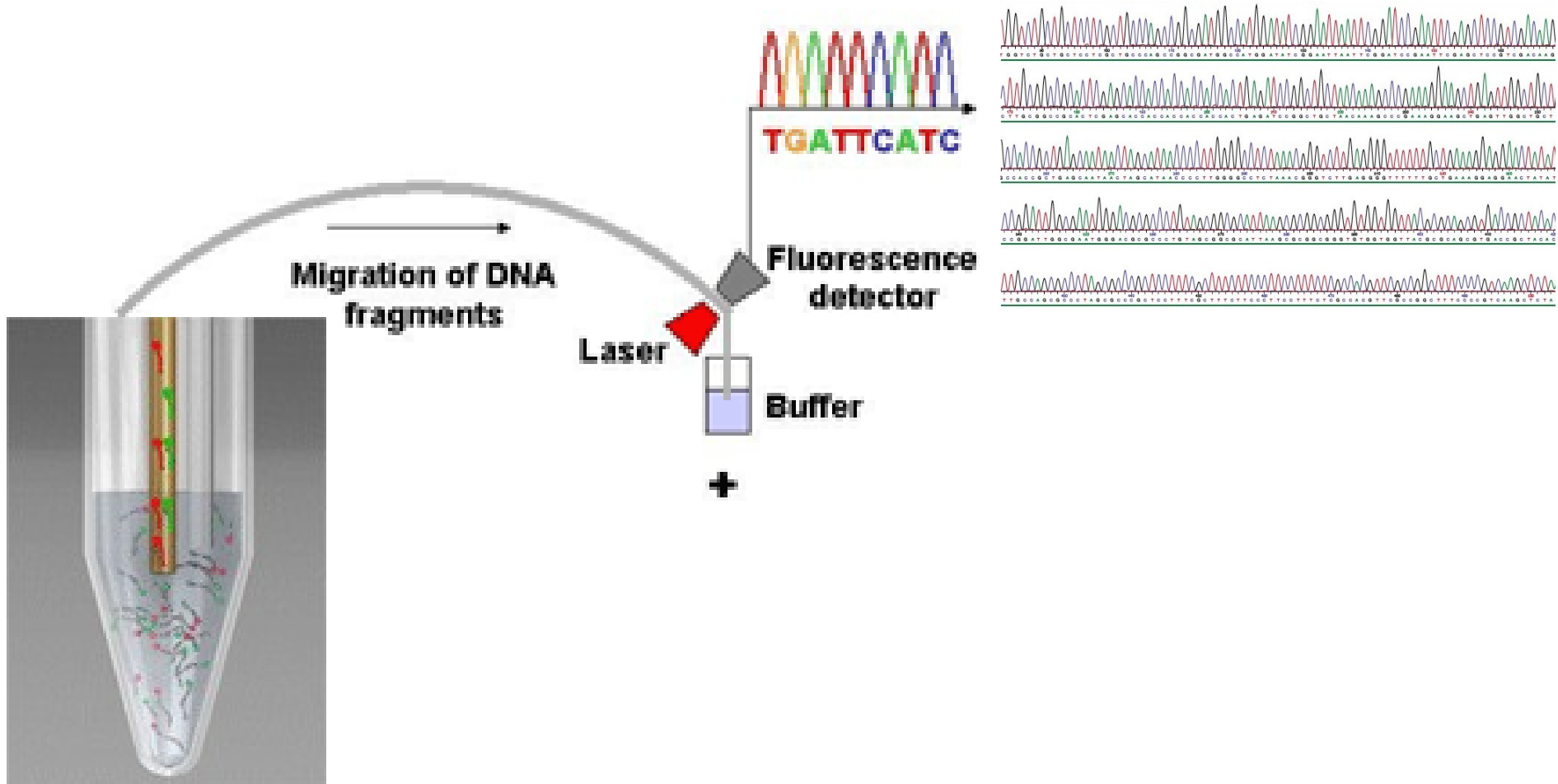
2. Sequence read (bottom to top) from gel autoradiogram



SEKVENOVÁNÍ DNA - zefektivnění Sangerovy metody vývoj kapilárních sekvenátorů

- Syntéza DNA je v principu totožná s asymetrickou PCR (tj. s jedním primerem) v normálním termocykleru, s extenzí řetězce *Taq* polymerázou.
- k detekci produktů jsou užívány fluorescenčně značené ddNTP = každý dideoxynukleotid má jinou značku – tzv. „**Dye-terminator sequencing**“
 - **Př.** ABI PRISM® Big Dye™ Terminator v 3.1. Ready Reaction Cycle Sequencing Kit
- **Polymerizační reakce probíhá v jednom vzorku**
- během PCR dochází k produkci fragmentů lišících se o jednu bázi
- detekce produktů probíhá během elektroforetické migrace v kapiláře pomocí laserového detektoru
- sekvence je zaznamenána přímo do paměti počítače
- **500 – 700 bp/run**

SEKVENOVÁNÍ DNA - zefektivnění Sangerovy metody vývoj kapilárních sekvenátorů



Vzorek s fluorescenčně značenými fragmenty po PCR

SEKVENOVÁNÍ DNA - zefektivnění metody vývoj kapilárních sekvenátorů

Kapiláry

- vnitřní průměr 50 μ m
- naplněny gelem s nízkou viskozitou, který nahradil polyakrylamid (dříve kapiláry nešlo opakovaně používat)
- kratší časy analýz
- plně automatizované systémy



SEKVENOVÁNÍ DNA

Limity klasických sekvenačních metod a nové metody

- v jedné reakci lze osekvenovat úseky dlouhé 300–1000 nukleotidů
- zpravidla prvních 10–40 nukleotidů nemá optimální kvalitu
- automatické sekvencery mají limit 384 vzorků na 1 běh přístroje, 24 běhů za den
- trend snižovat náklady na sekvenace
- **Archon X prize for Genomics**
 - 10 mil. USD prvnímu týmu, který během 10 dní dokončí sekvenaci 100 lidských genomů za cenu 10 tis. USD / genom
- nástup **Next gene sequencing technologií (NGS sequencing)**
 - vysoce výkonné sekvenační technologie
 - paralelně probíhající sekvenační reakce, produkují tisíce – miliony sekvencí v jednom běhu

Databáze sekvencí DNA

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

The image shows a screenshot of the NCBI (National Center for Biotechnology Information) website. The page has a blue header with the NCBI logo and navigation links like 'Resources' and 'How To'. Below the header is a search bar with 'All Databases' selected. On the left is a vertical sidebar with a list of categories: NCBI Home, Site Map (A-Z), All Resources, Chemicals & Bioassays, Data & Software, DNA & RNA, Domains & Structures, Genes & Expression, Genetics & Medicine, Genomes & Maps, Homology, Literature, Proteins, Sequence Analysis, Taxonomy, Training & Tutorials, and Variation. The main content area is titled 'Welcome to NCBI' and includes a paragraph about the center's mission, links for 'About the NCBI', 'Mission', 'Organization', 'Research', and 'RSS Feeds', and a 'Get Started' section with links for Tools, Downloads, How-To's, and Submissions. There is also an 'Education Resources' section. On the right, there are sections for 'Popular Resources' (listing BLAST, Bookshelf, Gene, Genome, Nucleotide, OMIM, Protein, PubChem, PubMed, PubMed Central, and SNP), 'NCBI News' (with a 'New NCBI Newsletter' link and a date of 01 Dec 2011), and a notice about the SRA database with a date of 13 Oct 2011. At the bottom, there is a footer with five columns: 'GETTING STARTED' (with links to NCBI Education, NCBI Help Manual, NCBI Handbook, and Training & Tutorials), 'RESOURCES' (with links to Chemicals & Bioassays, Data & Software, DNA & RNA, Domains & Structures, Genes & Expression, and Genetics & Medicine), 'POPULAR' (with links to PubMed, Nucleotide, BLAST, PubMed Central, Gene, and Bookshelf), 'FEATURED' (with links to GenBank, Reference Sequences, Map Viewer, Genome Projects, Human Genome, and Mouse Genome), and 'NCBI INFORMATION' (with links to Write to the Help Desk, About NCBI, Research at NCBI, NCBI Newsletter, NCBI FTP Site, NCBI on Facebook, and NCBI on Twitter). Two light blue callout bubbles are overlaid on the right side of the page. The top bubble points to the 'Popular Resources' section and contains the text 'Mám sekvenci a neznám organismus, gen'. The bottom bubble points to the 'NCBI News' section and contains the text 'hledám sekvenci organismu, genu'.

NCBI Resources How To

NCBI
National Center for
Biotechnology Information

All Databases

NCBI Home
Site Map (A-Z)
All Resources
Chemicals & Bioassays
Data & Software
DNA & RNA
Domains & Structures
Genes & Expression
Genetics & Medicine
Genomes & Maps
Homology
Literature
Proteins
Sequence Analysis
Taxonomy
Training & Tutorials
Variation

Welcome to NCBI

The National Center for Biotechnology Information advances science and health by providing access to biomedical and genomic information.

[About the NCBI](#) | [Mission](#) | [Organization](#) | [Research](#) | [RSS Feeds](#)

Get Started

- Tools: Analyze data using NCBI software
- Downloads: Get NCBI data or software
- How-To's: Learn how to accomplish specific tasks at NCBI
- Submissions: Submit data to GenBank or other NCBI databases

Education Resources

Central point of access for help documents, teaching materials, news outlets, and other educational resources.

Popular Resources

- BLAST
- Bookshelf
- Gene
- Genome
- Nucleotide
- OMIM
- Protein
- PubChem
- PubMed
- PubMed Central
- SNP

NCBI News

New NCBI Newsletter

01 Dec 2011
Information on the new Genome Site, a new 16S BLAST database, updates to Sequin,

NCBI will continue to operate SRA

13 Oct 2011
Subsequent to an announcement in February 2011 that NCBI was planning to phase out the

[More...](#)

GETTING STARTED

- NCBI Education
- NCBI Help Manual
- NCBI Handbook
- Training & Tutorials

RESOURCES

- Chemicals & Bioassays
- Data & Software
- DNA & RNA
- Domains & Structures
- Genes & Expression
- Genetics & Medicine

POPULAR

- PubMed
- Nucleotide
- BLAST
- PubMed Central
- Gene
- Bookshelf

FEATURED

- GenBank
- Reference Sequences
- Map Viewer
- Genome Projects
- Human Genome
- Mouse Genome

NCBI INFORMATION [Write to the Help Desk](#)

- About NCBI
- Research at NCBI
- NCBI Newsletter
- NCBI FTP Site
- NCBI on Facebook
- NCBI on Twitter

Databáze sekvencí DNA

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Využití při výuce:

– Viz doplňkové materiály:

1. „Mošna zmrzlého šamana“ ☺ ☺ ☺

- V Alpách nalezena mumie s mošnou (batohem) (Otzi II.) obsahující pečlivě zabalené kožené váčky s rozdrceným obsahem pravděpodobně rostlinného původu
- Ze vzorků odebraných z těchto váček byla izolována DNA a byla provedena sekvenace ITS oblasti
- Zadání:
 - Z dodaných částí sekvencí sestavte kompletní sekvenovanou oblast (úseky se překrývají)
 - Jaká je délka sekvenované oblasti (počet nukleotidů)
 - Identifikujte biologický materiál, ze kterého vzorek pochází (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>; BLAST)
 - K čemu mohl být používán tento materiál



Každému studentovi zadat k hledání jednu sekvenci (musí ji složit z několika překrývajících se úseků →

Databáze sekvencí DNA

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>



1. Cvičení „Mošna zmrzlého šamana“ – příklad řešení 1 studenta/skupiny

A) Dodané části sekvencí

- Excel,
- Vytisknuté, nastříhané

```
AGGAACAATAAAAGATTATCGCGTGGCTCGTGCGGTGGCCCGGAGACGGTGTCCGCCA
CGGTGGCCCGGAGACGGTGTCCGCCAATCGAGATGCGTGTTC
CGGTGTCCGCCAATCGAGATGCGTGTTCGAAATGTC
ACGAACCCCGGCGCAATCTGCGCCAAGGAACAATAAAAGATTA
CGGGCTAACGAACCGCGGCGCAATCTGCGCCAAGGAACA
ACCGCGCCCGCACCTGCTGGGAGAAATCTCGGCGGGGCTAACG
GGCGGGCGGAGAGGAGCTTGCTCCTTGGACCGCGCGCA
CGACCCGTGAACACGTTTTAAACAGCTTGGGCGGGCGA
TCGAAACCTGCAACAGCAGAACGACCCGTGAACAC
```

B) Překryv sekvencí – konce se překrývají, přepis výsledné sekvence do PC

```
TCGAAACCTGCAACAGCAGAACGACCCGTGAACACGTTTTAAACAGCTTGGGCGGGCGAGAGGAGCTTGC
TCGAAACCTGCAACAGCAGAACGACCCGTGAACAC
CGACCCGTGAACACGTTTTAAACAGCTTGGGCGGGCGA
GGCGGGCGAGAGGAGCTTGC
```

C) Výsledná sekvence

```
TCGAAACCTGCAACAGCAGAACGACCCGTGAACACGTTTTAAACAGCTTGGGCGGGCGAGAGGAGCTTGC
TCCTTGACCCGCGCACCTGCTGGGAGAAATCTCGGCGGGCTAACGAACCCCGGCGCAATCTCGGCCA
AGGAACAATAAAAGATTATCGCGTGGCTCGTGCGGTGGCCCGGAGACGGTGTCCGCCAATCGAGATGCGT
GTTTATCGAAATGTC
```

→ **BLAST = Basic Local Alignment Search Tool** →

Databáze sekvencí DNA

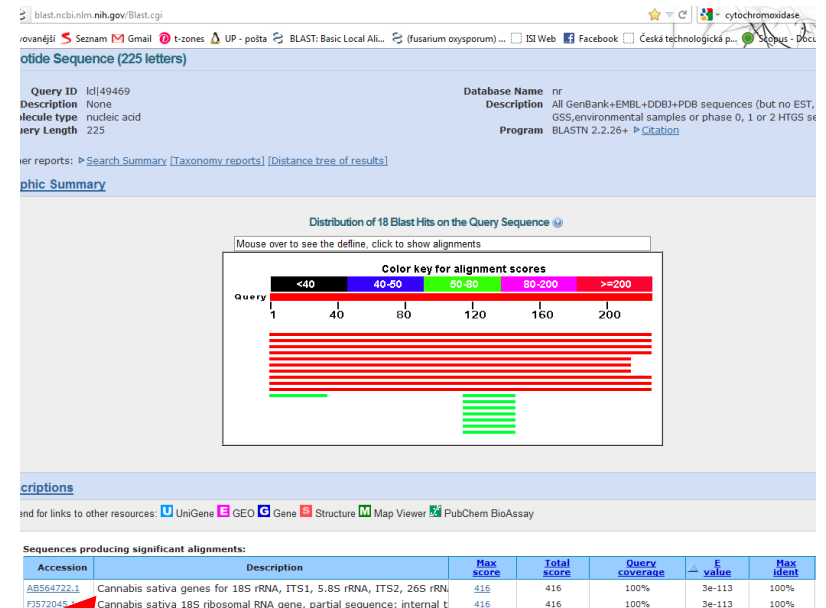
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

1. Cvičení „Mošna zmrzlého šamana“

- příklad postupu řešení 1 studenta/skupiny

D) Výsledná sekvence

```
TCGAAACCTGCAACAGCAGAACGACCCGTGAACACGTTTTAAACAGCTTGGCGGGCGAGAGGAGCTTGC  
TCCTTGGACCCGCCCCGCACCTGCTGGGAGAAATCTCGGCGGGCTAACGAACCCCGGCGCAATCTGCGCCA  
AGGAACAATAAAAGATTATCGCGTGGCTCGTGCGGTGGCCCGGAGACGGTGTCGCCCAATCGAGATGCGT  
GTTTATCGAAATGTC
```



Databáze sekvencí DNA

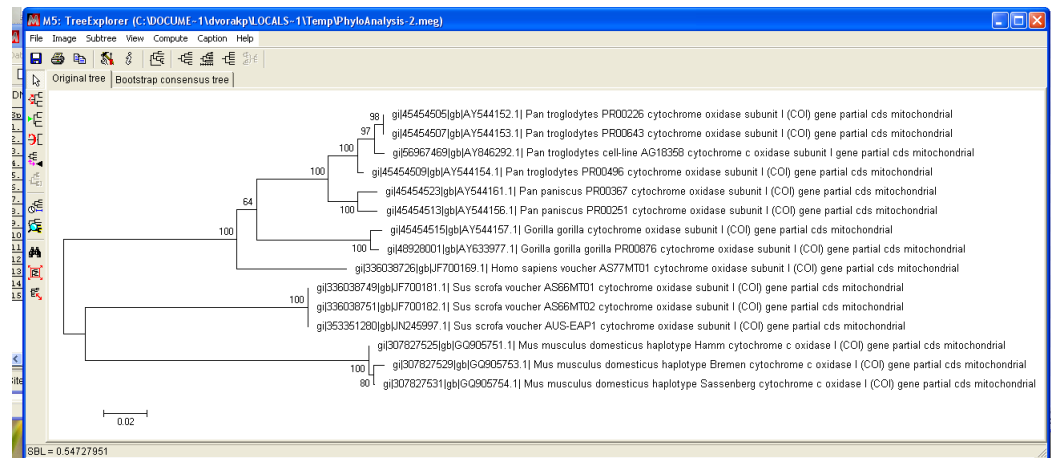
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Využití při výuce:

- Viz doplňkové materiály:

2. Konstrukce fylogenetického stromu

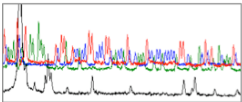
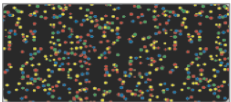
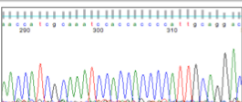
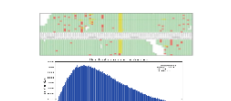
- volně stažitelný software MEGA5 a databáze
- získat sekvence vhodného genu pro různé organismy,
- připravit matici pro studenty s návodem,
- vymyslet zadání
- Příklad na genu COI (cytochromoxidáza) různých primátů, prasete, myši a člověka



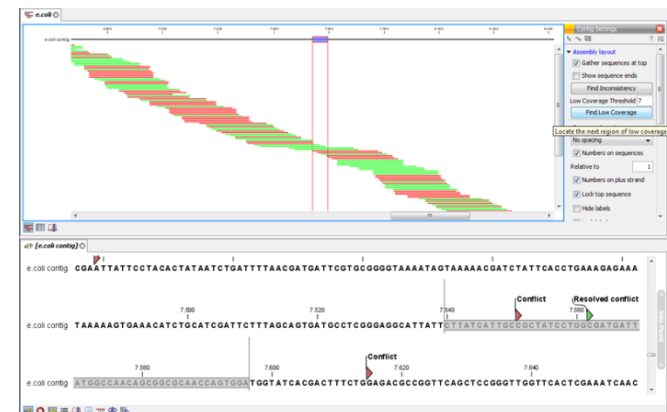
NGS = Next Generation Sequencing

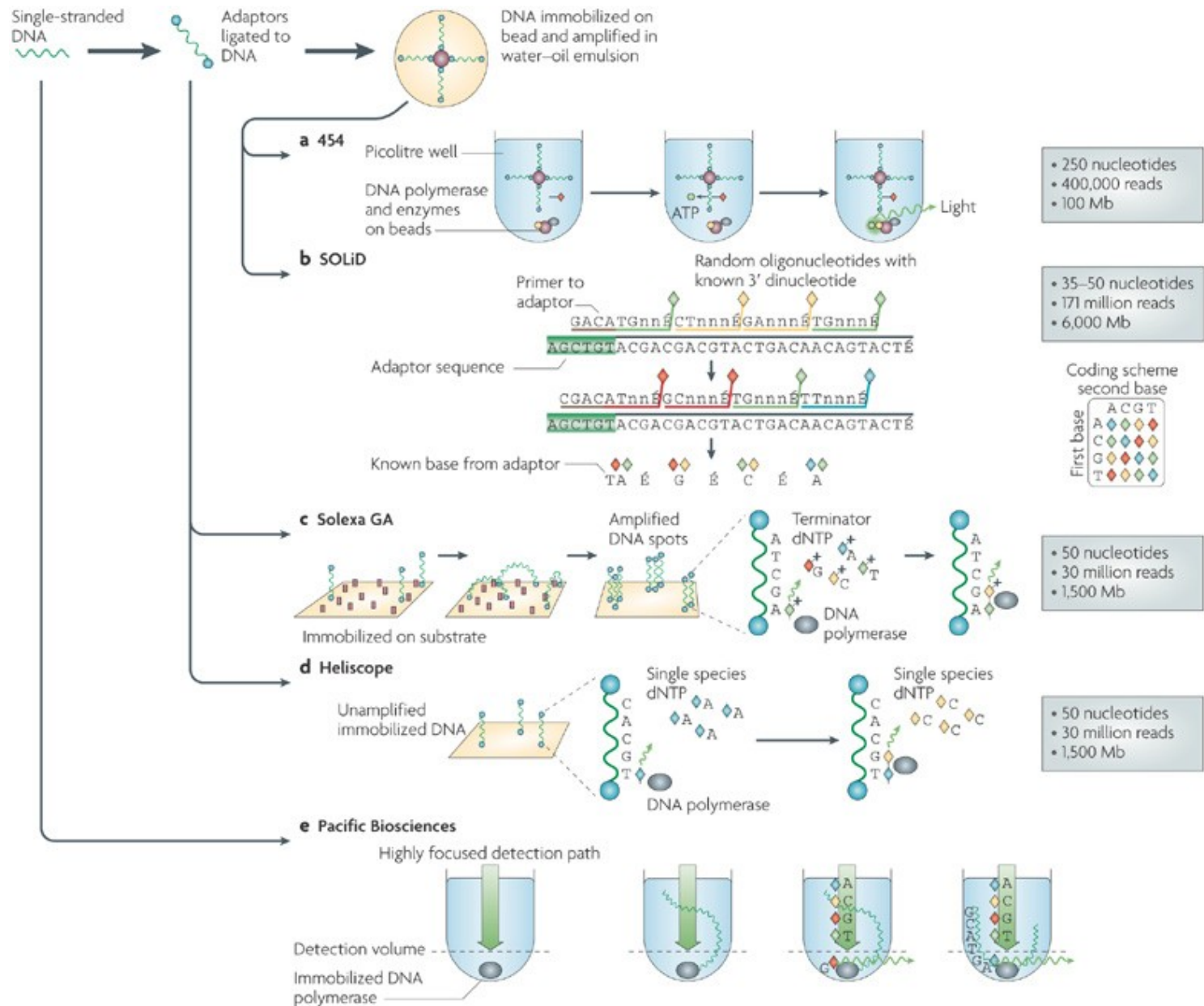
Celogenomové sekvenování

- paralelně probíhající sekvenační reakce
- produkují tisíce – miliony sekvencí v jednom běhu
- čtení kratších úseků (30–300bp)
- Obecný postup
 1. Izolace DNA
 2. Příprava DNA knihovny – PCR, klonování
 3. Vlastní sekvenace
 4. Vyhodnocení surových dat
 5. Sestavení konsenzuální sekvence

Levels of Data	Sanger	Next Gen
Level 0 Instrument data Signals, images		
Data Management		
Level1 Baseline corrections Analog to digital		Millions of sequences and quality values
Level 2 Data integration Calculations Science		

Copyright 2008 Geospiza, Inc.





454 – Pyrosekvenace

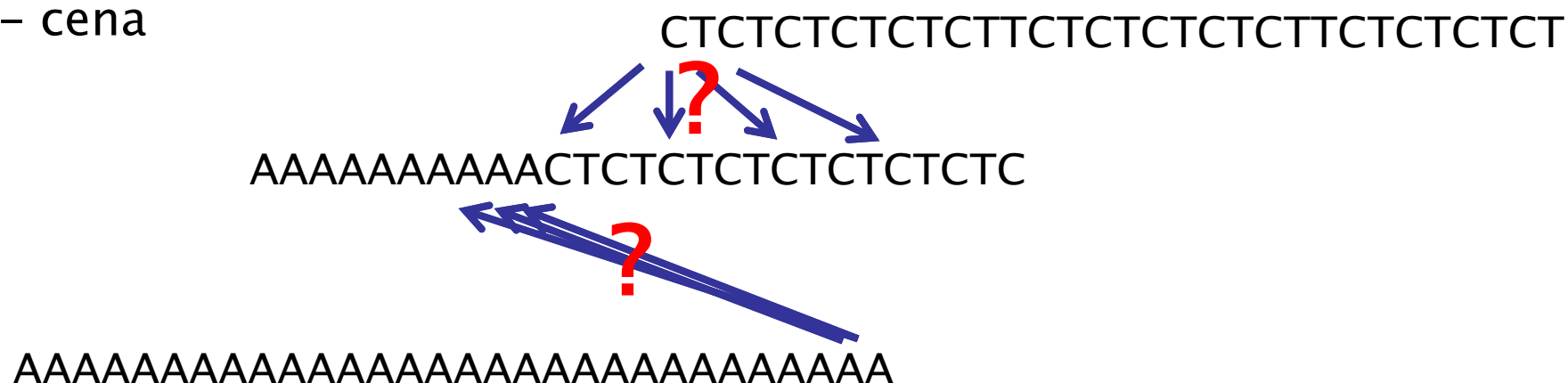
- první nová sekvenační metoda (1998)
- princip: detekce aktivity DNA-polymerázy během syntézy DNA

– Výhody:

- délka čtených úseků 700bp
- rychlost – sekv. cyklus 10 hodin
- sekvenace PCR produktů

– Nevýhody

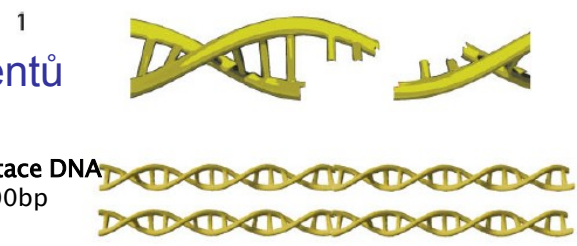
- překryvy homopolymerních oblastí
- cena



454 sekvenování

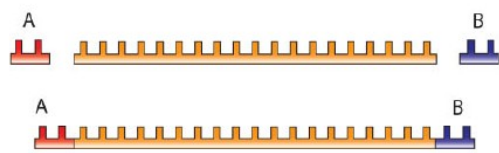
úseky 300 bp

- čteno 400 tisíc fragmentů najednou

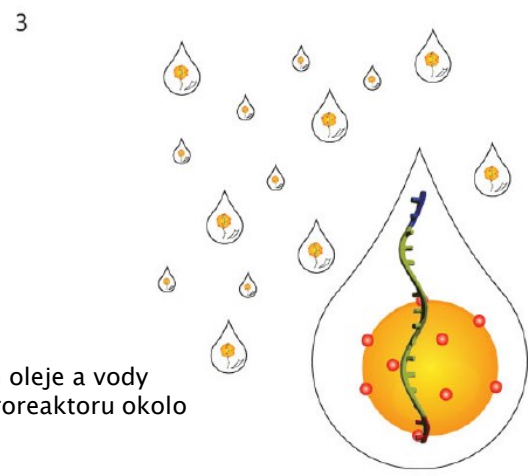


2

Ligace adaptorů
- B adaptor má biotinovou značku pro přichycení na streptavidinem obalenou magnetickou kuličku

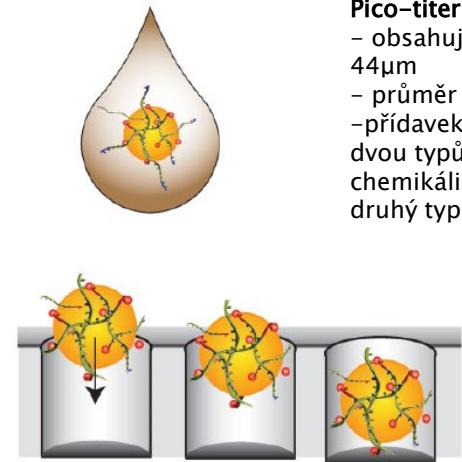


Emulzní PCR
- DNA kuličky do roztoku oleje a vody
- Protřepání = vznik mikroreaktoru okolo kuličky

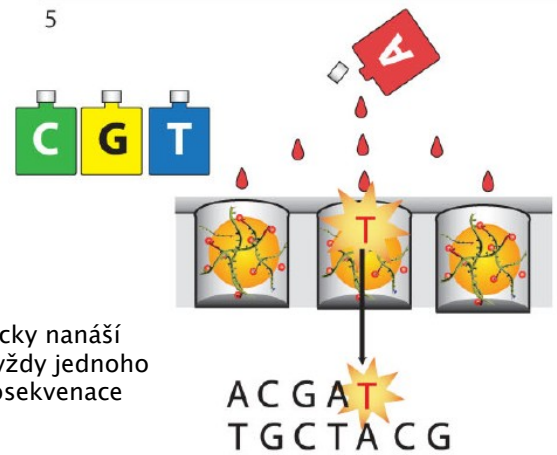


4

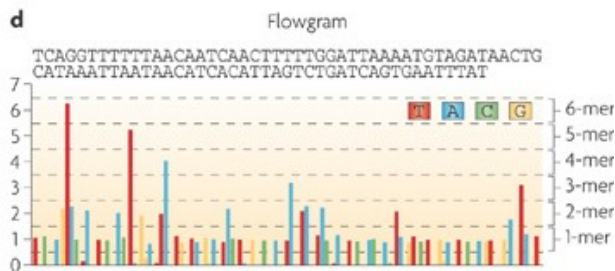
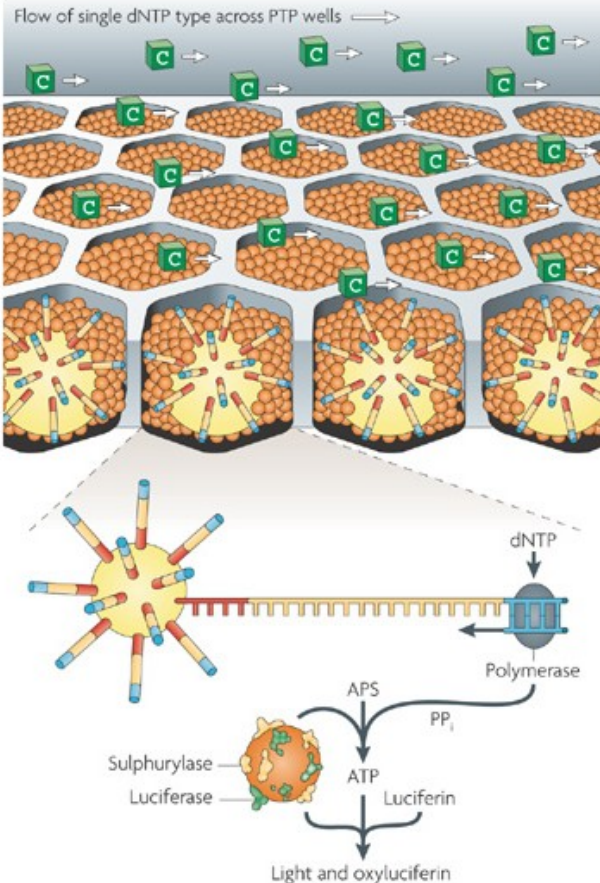
Pico-titer plate (sekvenační čip)
- obsahuje 1,6 mil jamek širokých 44µm
- průměr DNA kuličky je 26 µm
- přidavek menších kuliček dvou typů - jeden obsahuje chemikálie pro pyrosekvenaci, druhý typ fixuje kuličky s DNA



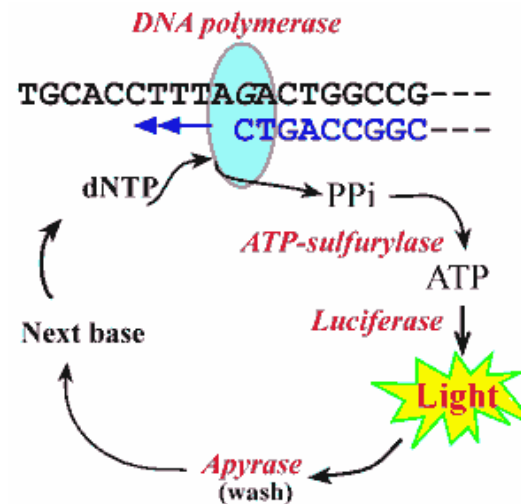
Sekvenační reakce
- Na destičku se cyklicky nanáší roztok polymerázy a vždy jednoho nukleotidu... viz. pyrosekvenace



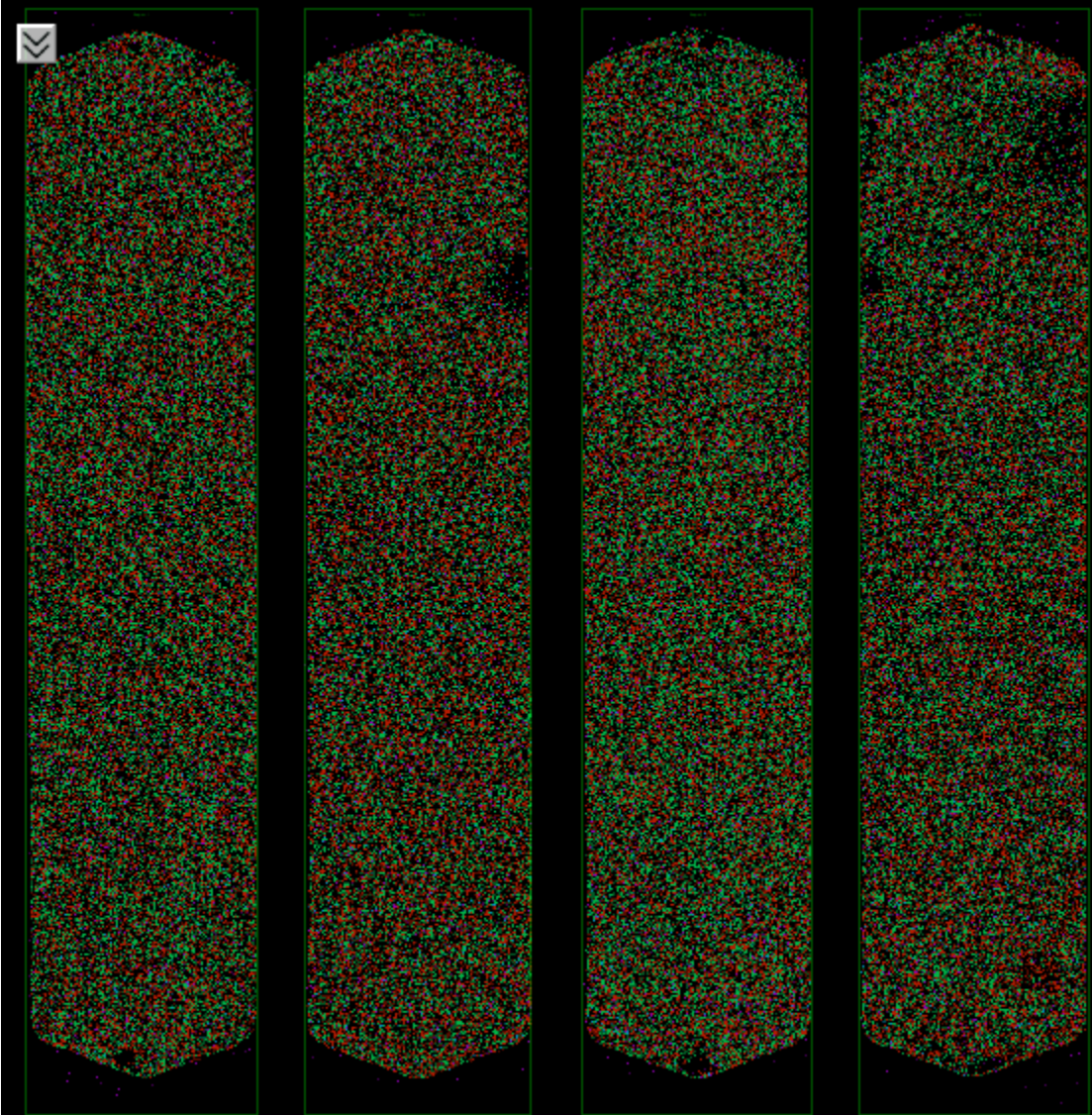
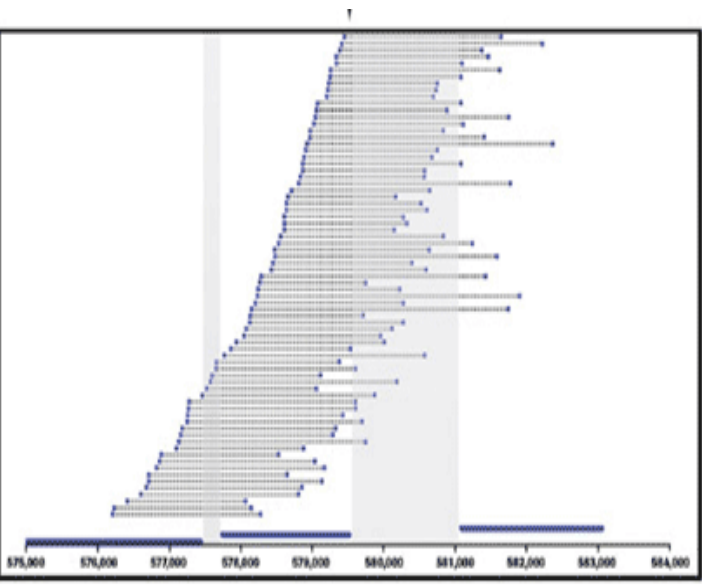
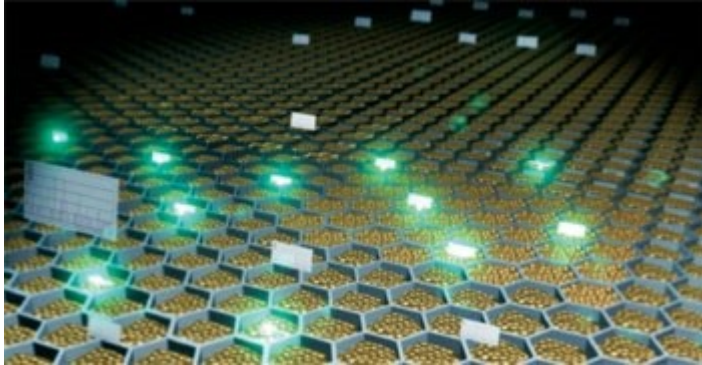
1–2 million template beads loaded into PTP wells



Pyrosekvenování



1. začlenění nukleotidu (konkrétní typ, ne směs)
2. uvolnění pyrofosfátu (PP_i)
3. Vznik ATP
 - Enzym ATP sulfuryláza katalyzuje vznik ATP reakcí PP_i s adenosinfosfosulfátem (APS)
4. Emise záření:
 - enzym luciferáza spotřebuje vzniklý ATP na oxidaci luciferinu – záblesk
5. Detekce záblesku
6. Enzym apyráza odstraní nespotřebované nukleotidy a ATP
7. Promytí systému
8. Změna typu nukleotidu ve směsi – krok č 1.



pico-titer plate from Roche's FLX

Illumina Genome Analyzer

- metoda sekvenace syntézou (SBS–sequencing by synthesis)
- r. 2006; úseky 35–50bp

– 1) Příprava knihovny

- fragmentace
- na konce dva adaptéry
- ELFO: vyříznou se fragmenty 150–200bp
- přečištění

– 2) Amplifikace fragmentů (bridge amplification)

- na sklíčku jsou oligonukleotidy komplementární k oběma adaptorům
- jednovláknové fragmenty se navážou na sklíčko – vytvoří „můstek“
- dosyntetizování komplementárního vlákna
- denaturace – dva identické fragmenty navázané na sklíčko blízko sebe
- opakování = vznik tisíců kopií těsně vedle sebe v tzv. „clusterech“

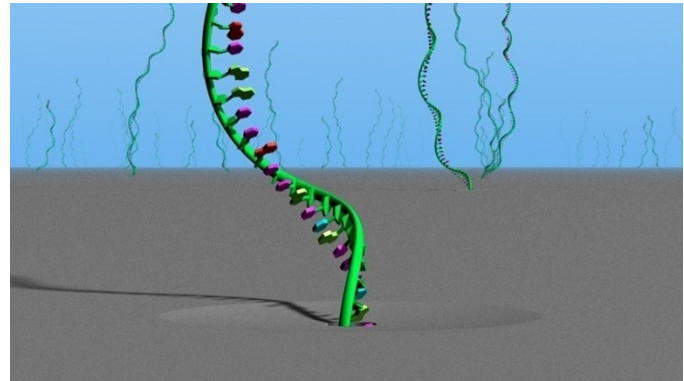
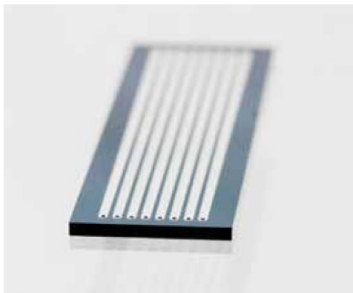
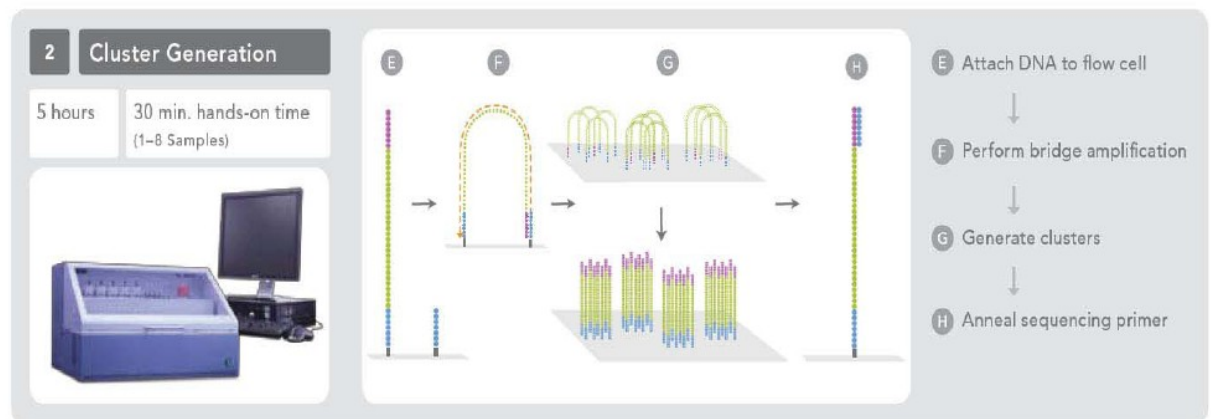


Figure 1: Illumina Flow Cell



Several samples can be loaded onto the eight-lane flow cell for simultaneous analysis on an Illumina Sequencing System.



Illumina Genome Analyzer

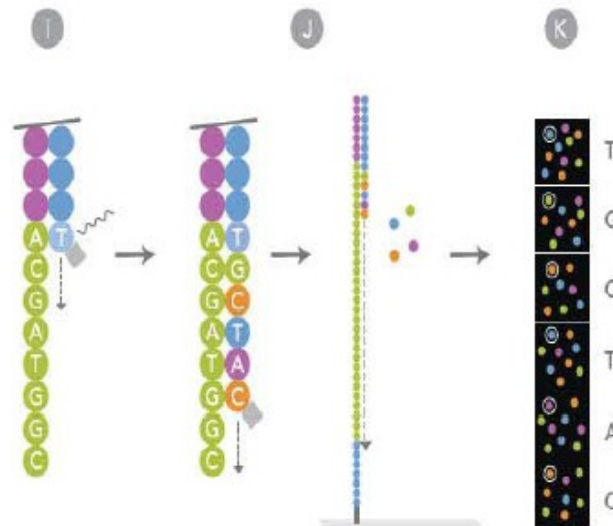
- 3) sekvenační reakce
 - v každém cyklu NARÁZ všechny nukleotidy
 - mají fluorescenční značku a modifikovaný 3' konec (brání zařazení více nukleotidů v jednom kroku)
 - zařazení nukleotidu provázené emisí světla, charakteristického pro daný nukleotid
 - detekce
 - odstranění fluoresc. značky a odblokování 3' konce
 - opakování postupu
 - x cyklů
 - zpracování dat

3 Sequencing

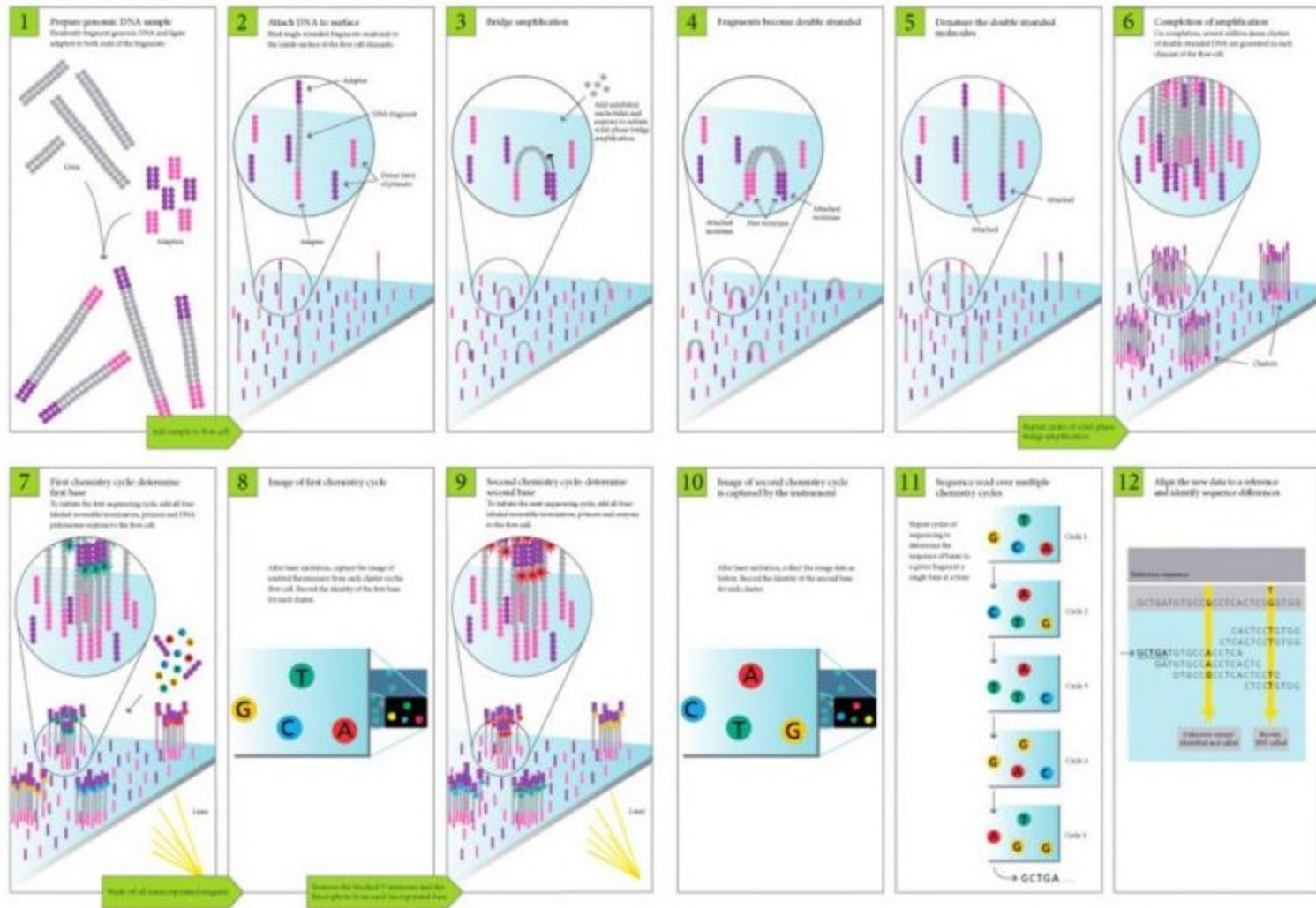
2-3 days (single-read)

4-6 days (paired-end)

30 min. hands-on time (1-8 Samples)

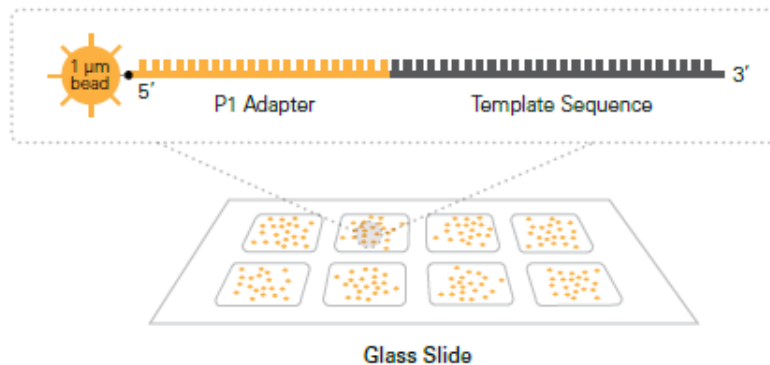


- I Extend first base, read, and deblock
- J Repeat step above to extend strand
- K Generate base calls

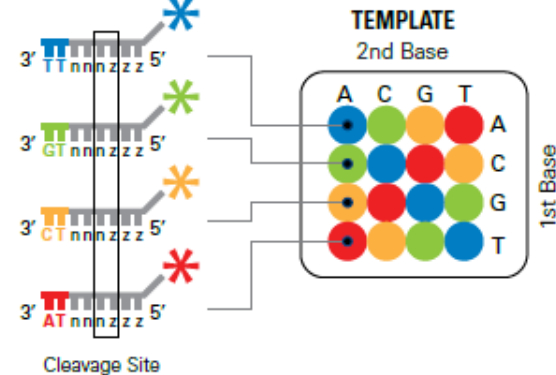


SOLiD sequencing

SOLiD™ Substrate



Di-base Probes



Sekvenace pomocí LIGACE krátkých oligo sond,

které jsou fluorescenčně značeny

+ cena

+ vysoká přesnost metody (99,95%)

+ malé množství vzorku

- čtené úseky: 100 bp

- náročnost zpracování dat a rychlost analýzy (týden)

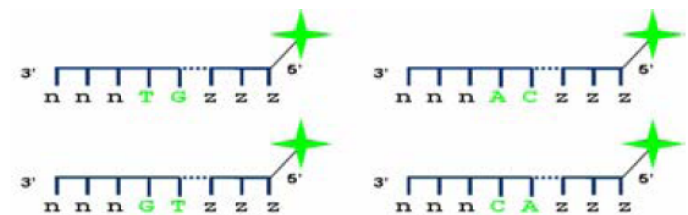
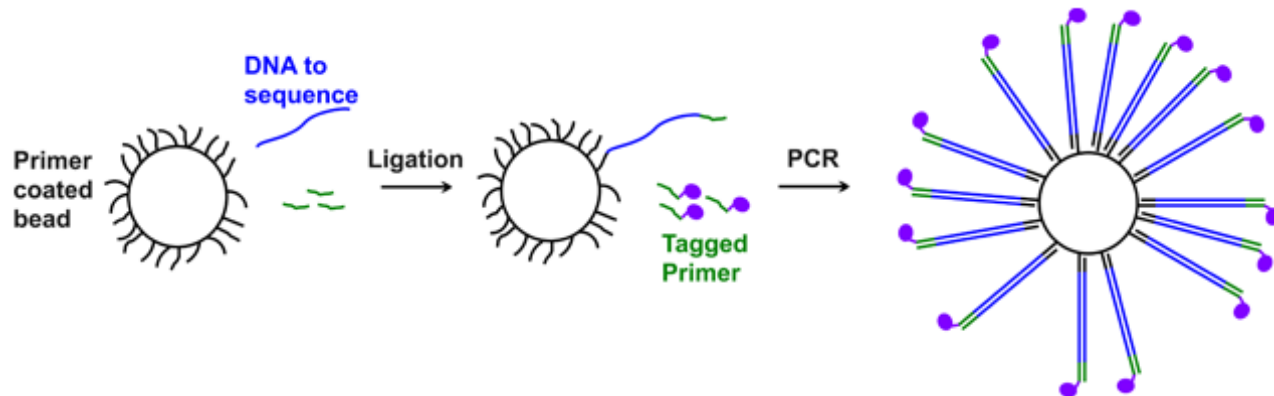


Figure 1. Each probe consists of 8 bases. As shown, the first 3 bases are degenerate (n), and the last 3 are universal (z), with the 4th and 5th bases as the two bases being interrogated. Thus, a single color observation only limits the potential dinucleotide to being four out of the 16 possible dinucleotides. As seen above, a green signal represents a AC, CA, TG or GT.

SOLiD sequencing

1. Příprava DNA knihovny

- Štěpení templátové DNA na kratší fragmenty
- Připojení adaptorů P1 a P2
- emPCR – amplifikace fragmentů na magn. kuličkách
- modifikace 5' konce – připojení na sekvenační destičku



2. Vlastní sekvenace

SOLiD sequencing – Sekvenační reakce

1. Navázání univ. primeru, ligace sondy

- Připojení univ. primeru k adaptoru P1
- Přidání oktamerních sond s fluoro. značkami

4 barvy, 16 kombinací koncových nukleotidů na 1. a 2. pozici

Pokud je sonda na 1. a 2. pozici komplementární k 1. a 2. pozici templátu – prodloužení řetězce DNA ligázou

2. Emise a detekce fluoresc. signálu

3. Odštěpení fluoresc. značky (štěpení sondy mezi 5. a 6. nukleotidem)

4. Opakování kroků 1. – 3. ... 7-krát = 35bp sekvence

5. Reset primeru – odštěpení nově nasynt. vlákna

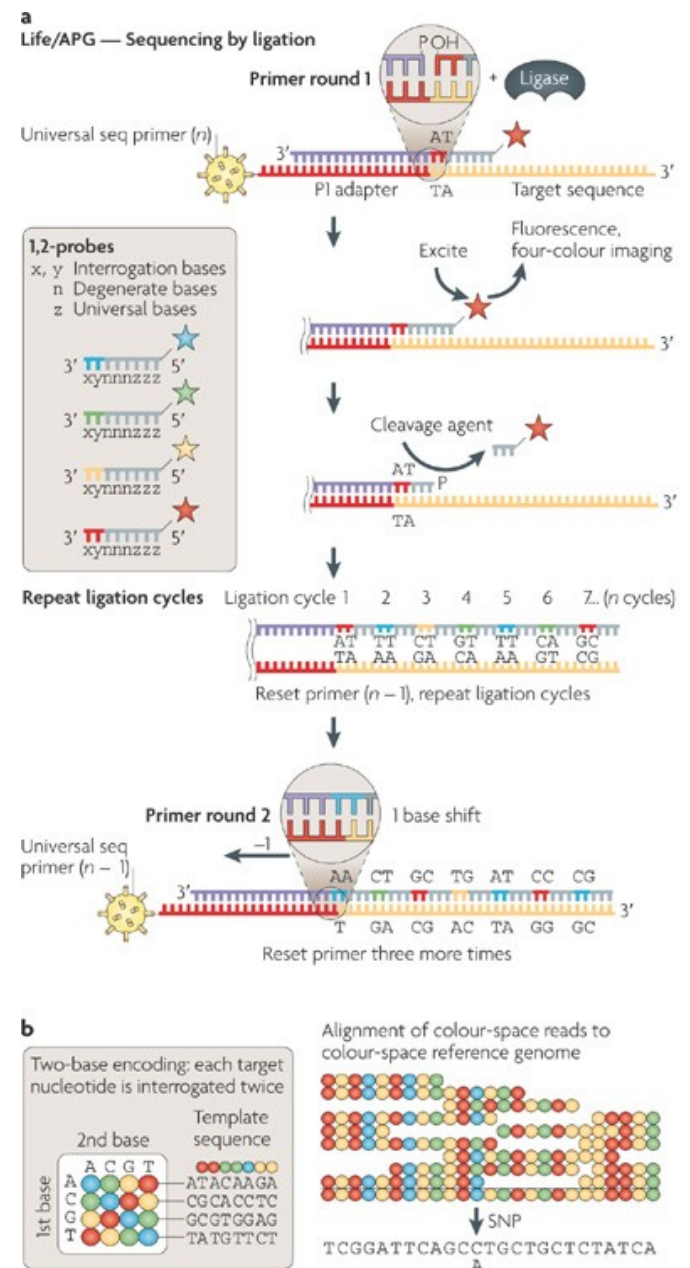
6. Napojení nového univ. primeru k adaptoru P1

- primer je o jeden nukleotid kratší

7. Opakování kroku 1.-6. s primery (n-2) až (n-6)

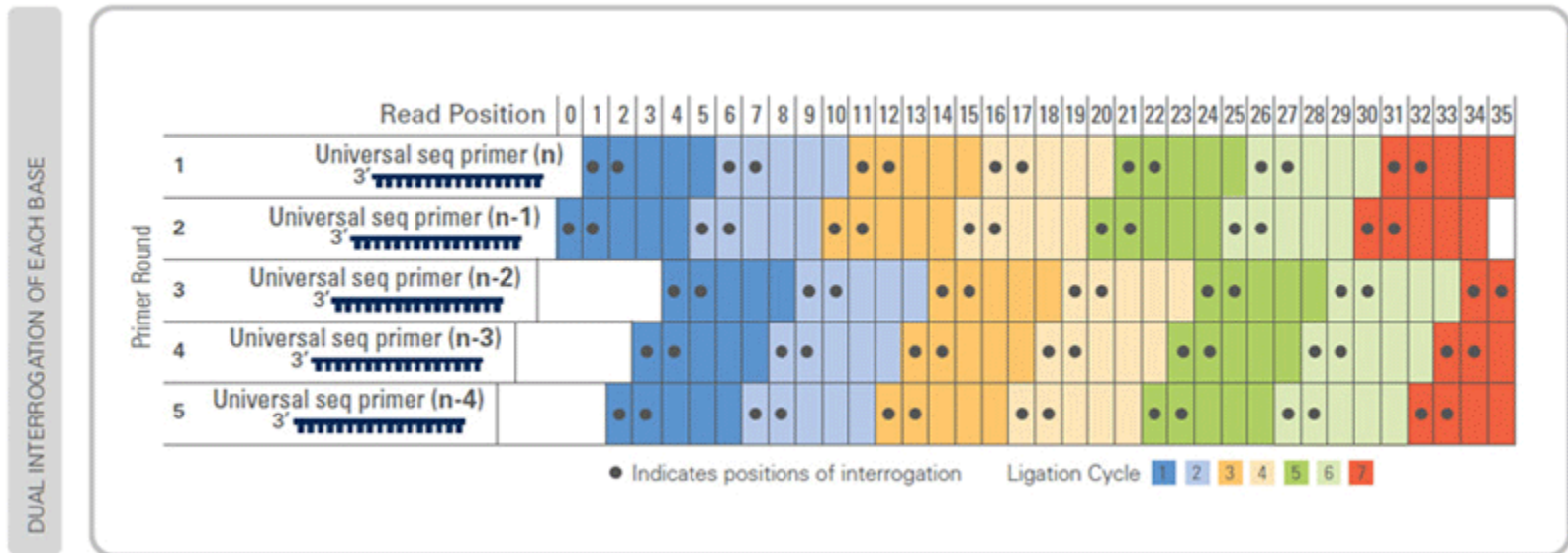
- celkem 5x = zajištění přečtení každého místa 2x

8. Vyhodnocení dat – dešifrování barevného kódu



8. Vyhodnocení dat – dešifrování barevného kódu

- každá báze je určena na základě dvou nezávislých sekvenačních cyklů





Semiconductor Sequencing for Life™

