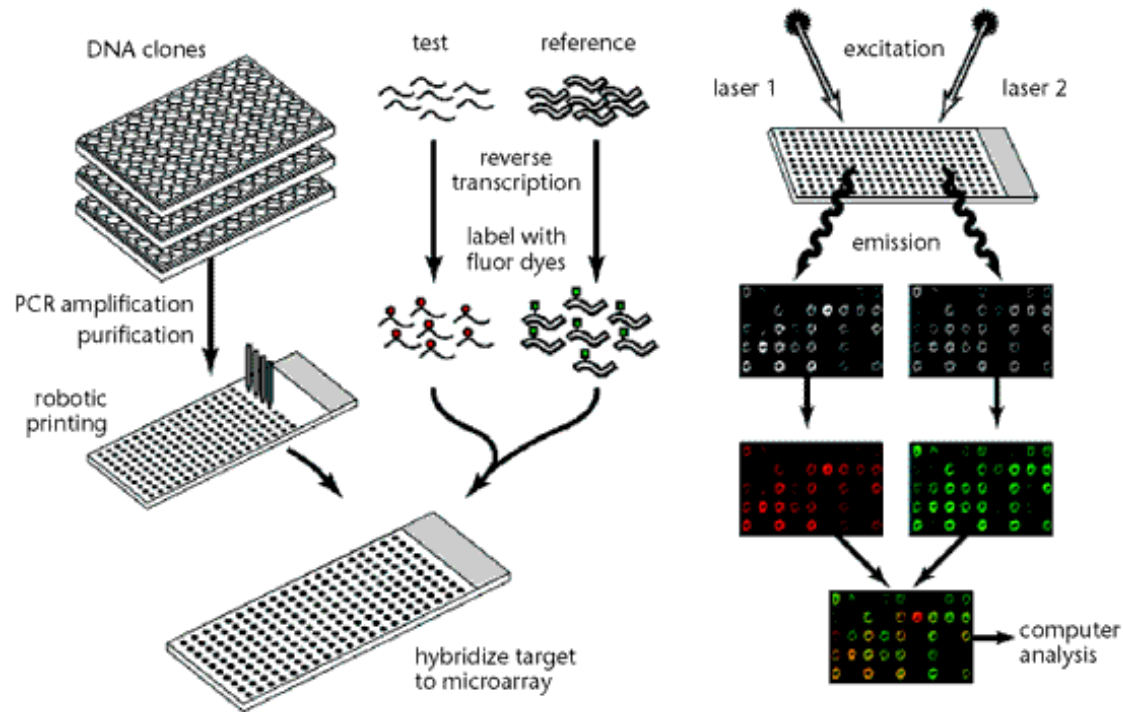


SEKVENOVÁNÍ NOVÉ GENERACE

Transkriptomika, genetika populací

Microarrays

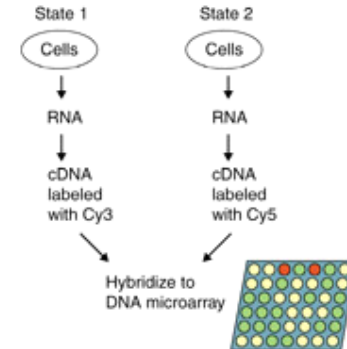
□ Schéma principu microarrays



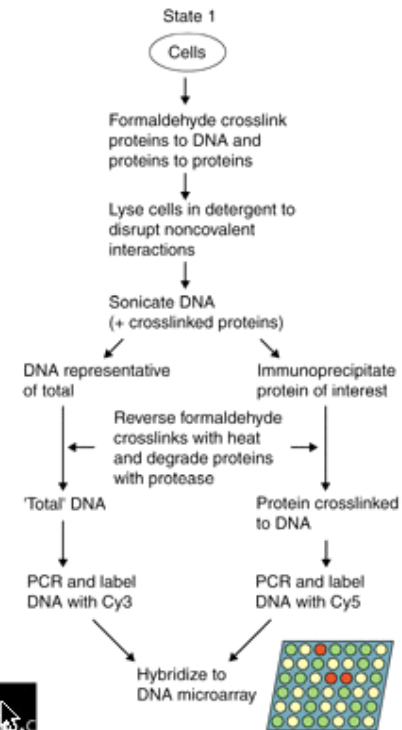
Aplikace Microarrays

- Studium exprese
- Srovnání expresí WT x mutant
- Nalezení míst DNA- protein interakcí

(a) Genome-wide expression analysis



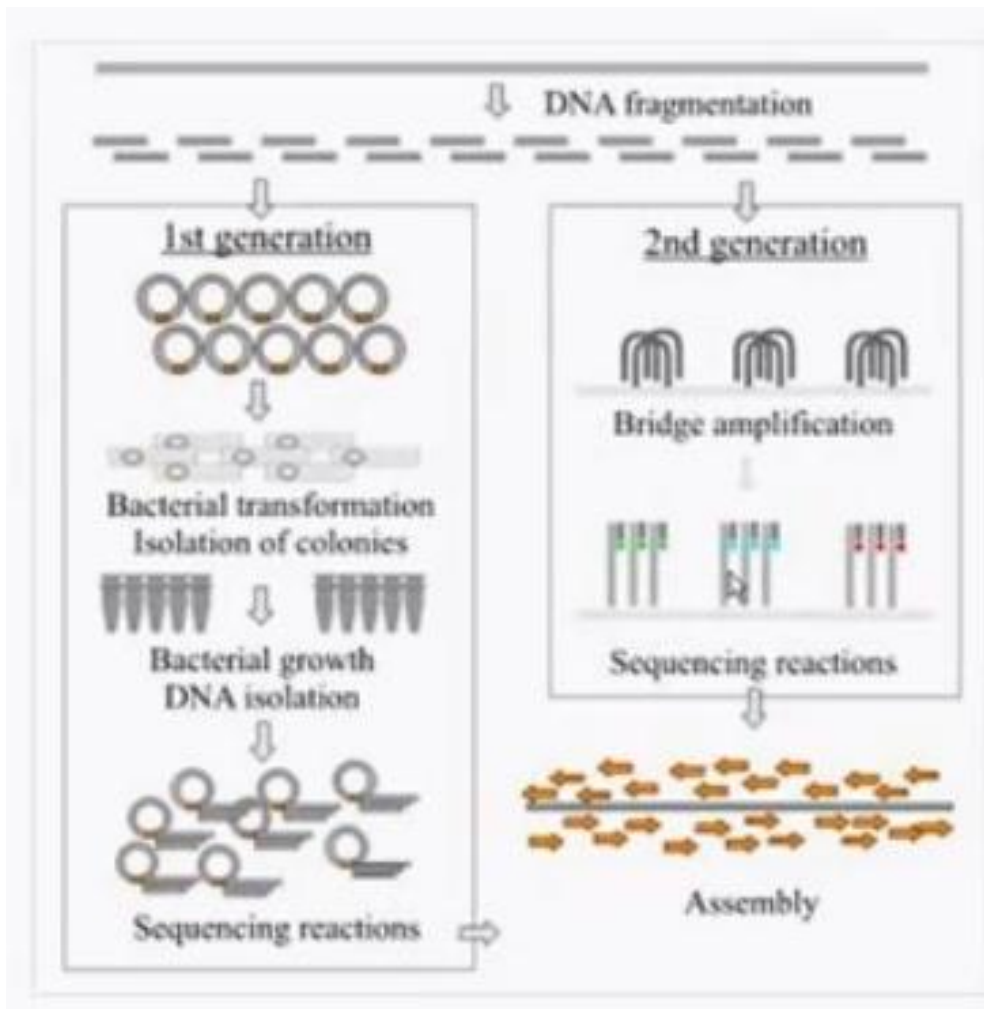
(b) Genome-wide location analysis



- Knowledge of DNA sequences has become indispensable for basic biological research, and in numerous applied fields such as diagnostic, biotechnology, forensic biology, and biological systematics. The rapid speed of sequencing attained with modern DNA sequencing technology has been instrumental in the sequencing of complete DNA sequences, or genomes of numerous types and species of life

úvod

- Pokroky v DNA sekvenování
 - Sekvenování nové generace –
 - Rozvojem technologií - zlevňování
 - 454 – ROCHE – princip – pyrosekvenování
 - Illumina – bisulfitová metoda sekvenování syntézou
 - Možnosti bioinformatických technik srovnávat sekvence
 - Rozvoj a přístupnost databází
- Pokrok v porozumění mikroorganismů a mikrobiálních komunit
 - Rozšiřuje poznání i na nekultivovatelné bakterie
 - Třetí zlatý věk mikrobiologie



1995

H. influenzae

1.8 Mb, 1 year, ≈ \$1M



2011

E. coli

5 Mb, 1 day, ≈ \$100

Illumina



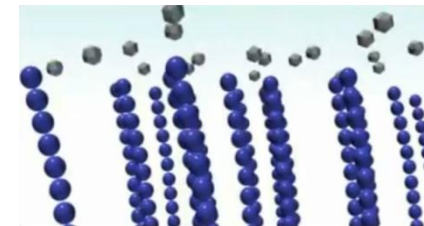
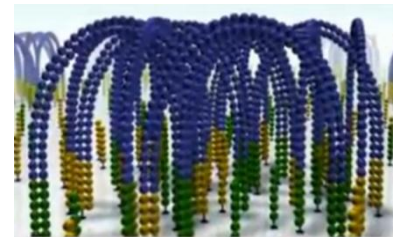
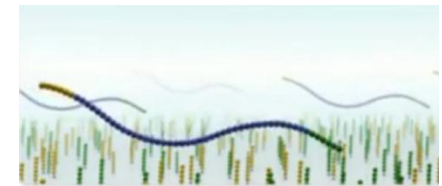
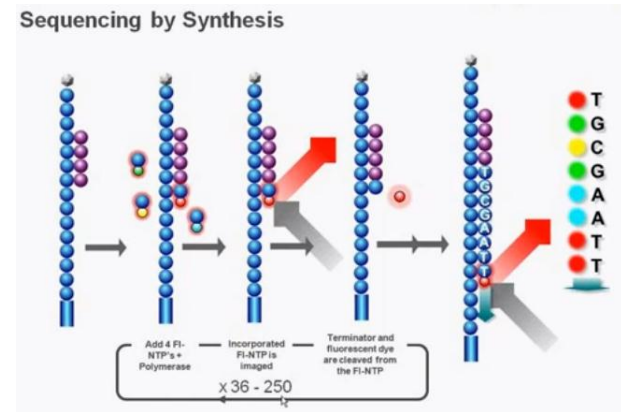
- Firma založená duben 1998-
 - vývoj, marketing vlastního systému
 - http://www.illumina.com/technology/sequencing_technology.ilmn

- Vlastnosti systému
 - Velká přesnost sekvencí
 - Menší pokrytí genomu –
 - Kratší fragmenty- složitější vyhodnocování
 - Přesnější při transkriptomice –

- Aplikace
 - De novo a resekvence genomů
 - Genotyping
 - Analýza exprese genů – sekvenace RNA
 - Detekce nekódujících malých RNA – rozlišení vláken DNA
 - Detekce množství RNA

<http://www.youtube.com/embed/45vNetkGspo?iframe&rel=0&autoplay=1>

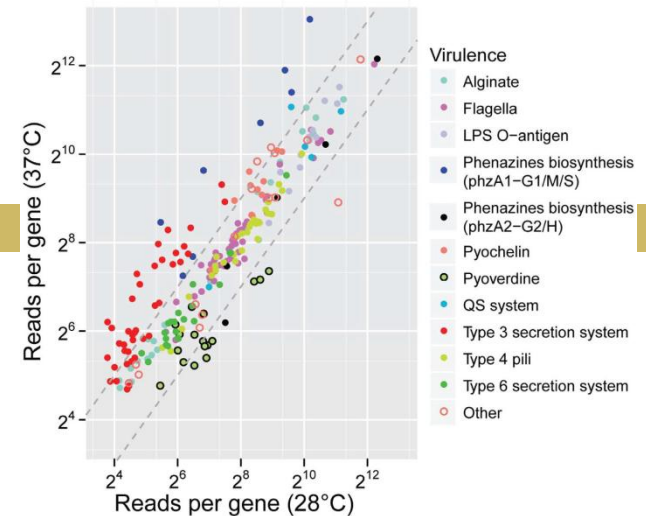
- Princip metody.
 - ▣ Sekvenování syntézou
 - ▣ Bisulfitová metoda
 - Flurescencně značené oligonukleotidy – 4 barvy
 - Všechny 4 najednou
 - Po navázání se barva odštěpí - signál
- Příprava knihovny
 - ▣ Fragmentace DNA
 - ▣ Ligace adaptérů
- Generace klastrů
 - ▣ Hybridizace s oligos na čipu
 - ▣ Amplifikace
 - ▣ Hybridizace s primery
- sekvenace



Illumina

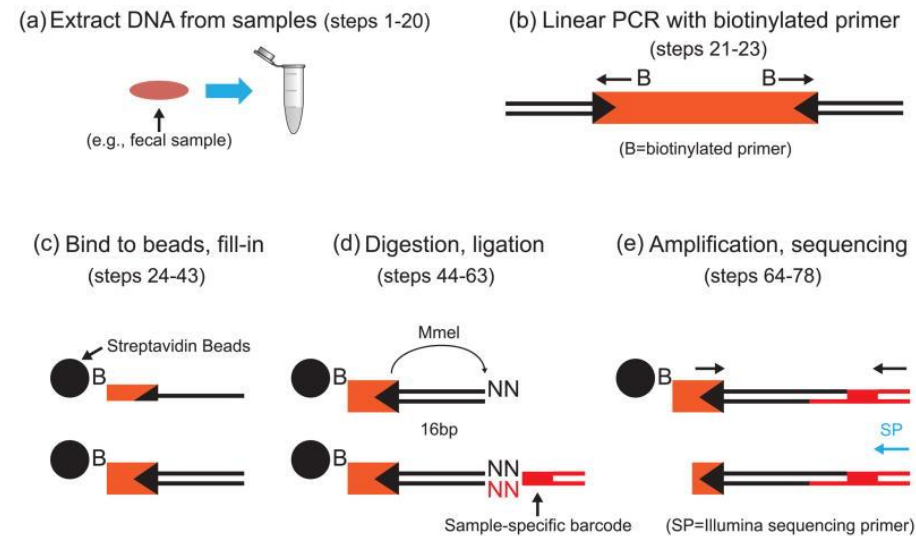
□ Příklady:

- **The Single-Nucleotide Resolution Transcriptome of *Pseudomonas aeruginosa* Grown in Body Temperature.** Omri Wurtzel, PLOS Pathogens, 2012, 8 (9), | e1002945

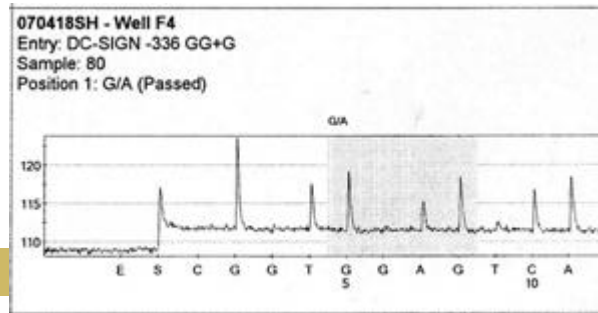


Transposon mutagenesis

- Vyhledávání inserce transpozonů.
 - Využití illumina systému
 - Insertion Sequencing (INSeq)
 - Mariner transpozon
 - Založeno na restrikci MmeI - $TCC(AG)ACN_{20/18}$
 - Štípá s 16 bp DNA mimo transpozon
 - Vazba na streptavidinové magnetické kuličky
- Identifying microbial fitness determinants by Insertion Sequencing (INSeq) using genome-wide transposon mutant libraries. [Andrew L. Goodman, Nat Protoc. 2011 November 17; 6\(12\): 1969–1980.](http://www.nature.com/nprot/journal/v6/n12/full/nprot.2011.417.html#bx1)
- <http://www.nature.com/nprot/journal/v6/n12/full/nprot.2011.417.html#bx1>



454 sekvenování



□ Pyrosekvenování

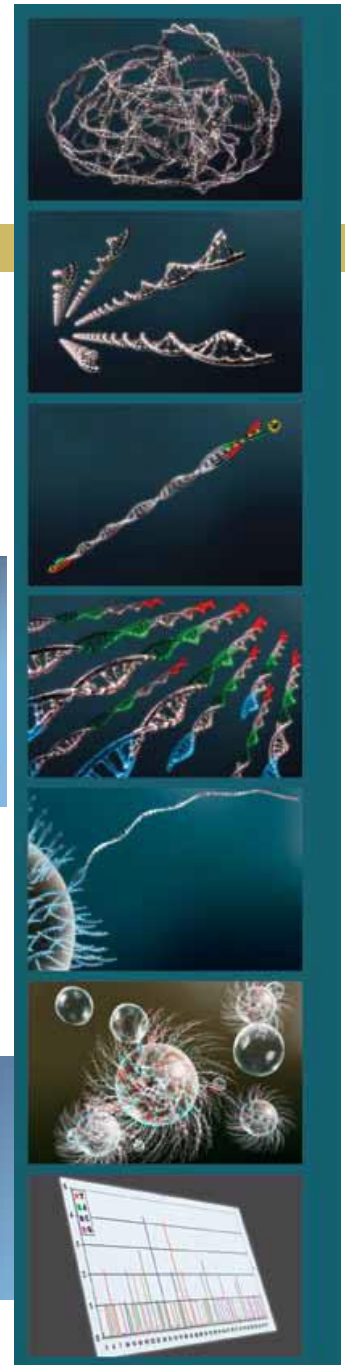
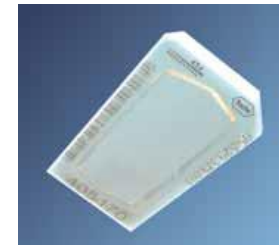
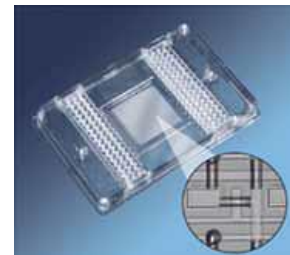
□ princip –454 ROCHE – založeno na emulsní PCR - www.454.com

□ Dva přístupy –

■ Shotgun sequencing - Náhodná degradace genomové DNA

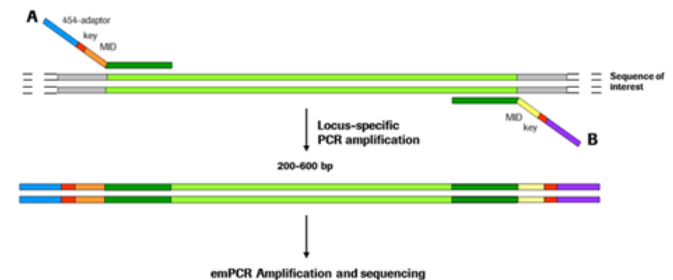
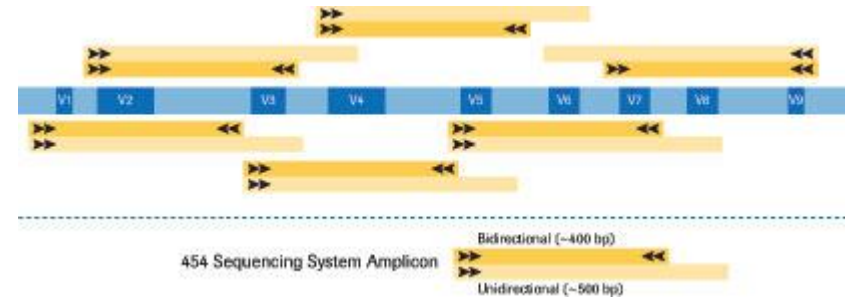
■ Targeted sequencing - určitý PCR produkt

- Ligace nástavců
- Vazba na mikrokuličky – jeden fragment – jedna kulička
- Amplifikace emulsní PCR – jedna kulička v jedné micelle
- Sekvenace
 - – jedna kulička – jedna sekvence
 - – v mikrotitračních destičkách
 - – každá kulička zapadne do jedné dírky
- Počítačové vyhodnocení



454 sekvenování

- Mnoho aplikací – obdobné jako Illumina
 - De novo sekvenování genomů –
 - prokaryotní v jednom běhu, jeden týden
 - Vytvoření referenční genomové sekvence
 - Komparativní analýza na genomové úrovni
 - Strukturní přeskupení genomu –inverse, inserce, velké delece
 - Identifikace horizontálního přenosu, ortologů genů,
 - PCR produkty určitého genu, lokusu – 400bp
 - Detekce genových variant – evoluční aspekty,
 - detekce bodových mutací – korelace fenotyp x mutace
 - Detekce variant s nízkou frekvencí výskytu v populaci buněk (1 %)
 - Strategie navržení primerů
 - Možnost přiřazení k určitému klonu



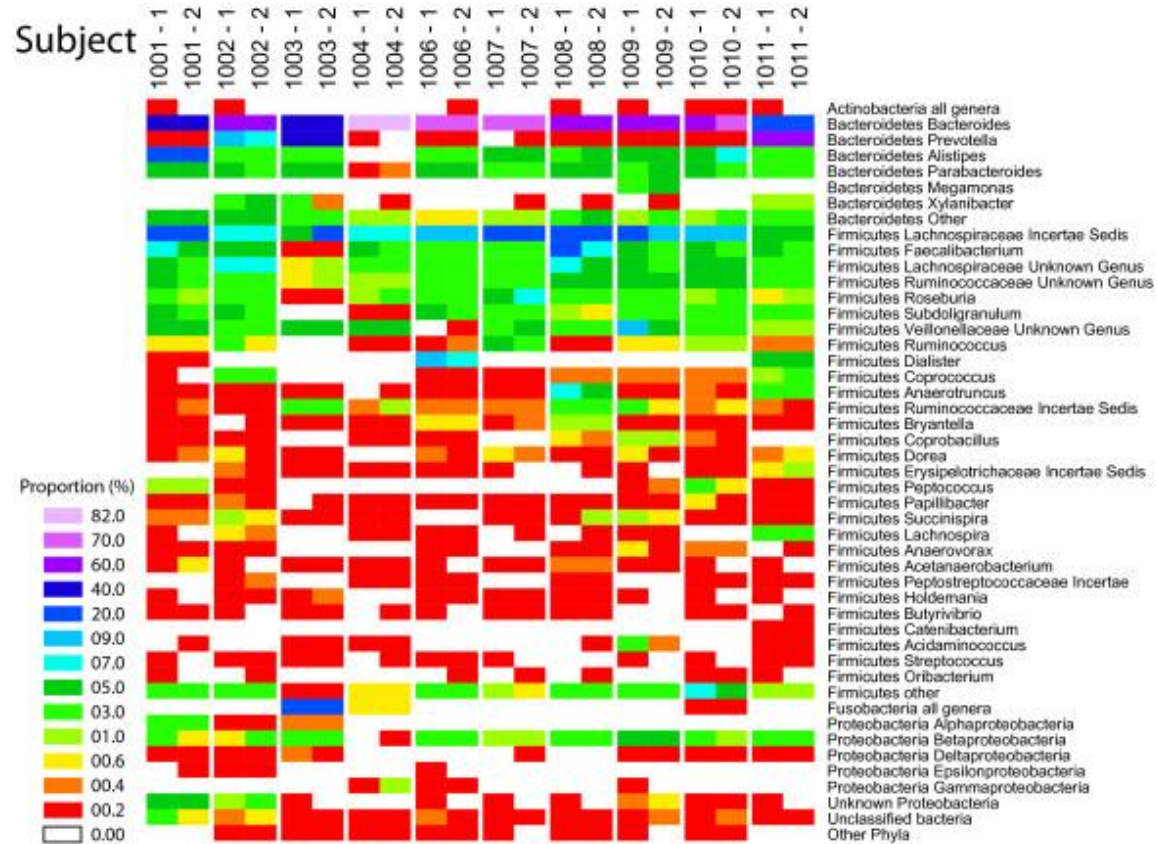
454 sekvenování

□ Metagenomika

- Diversita mikrobiálních populací –
- Analýza genů a genomů obsažených v komunitě
 - 16S rDNA - targeted sequencing
 - Analýza relativního zastoupení jednotlivých druhů za různých podmínek
- Shot gun strategie – DNA/RNA izolovaná z určité komunity (půda, pacient)
 - Identifikace nových genů v nekultivovatelných mikroorganismech
 - Identifikace nových patogenů v infikovaných pacientech amplifikací RNA
 - Genová exprese v mikrobiálních komunitách za různých podmínek
- Enzymové aktivity – určité geny charakterizující populaci, syntéza antibiotik

454 sekvenování

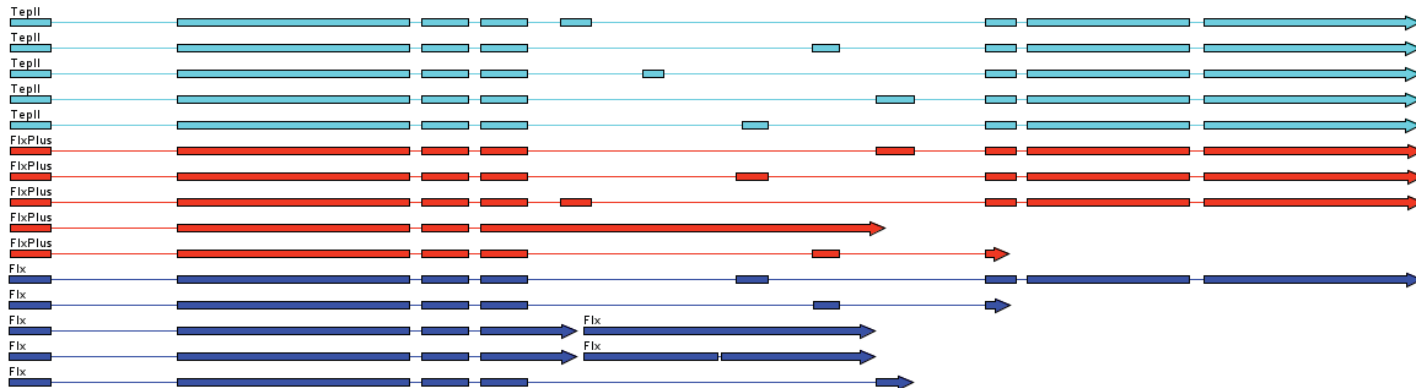
□ Příklady:



- Sampling and pyrosequencing methods for characterizing bacterial communities in the human gut using 16S sequence tags. [Wu GD et al. BMC Microbiol. 2010,](#)
- Characterization of soil bacterial community structure and physicochemical properties in created and natural wetlands. [Peralta RM, Ahn C, Gillevet PM. Sci Total Environ. 2012 Dec 7;443C:725-732. doi: 10.1016](#)

454 sekvenování

- **Transkriptomika**
- Sekvence transkriptomů
 - ▣ De novo sekvenování transkriptomů
 - Alternativa k sekvenaci celých genomů – pouze aktivní geny za určitých podmínek
 - Možnost kvantifikace – podle četnosti sekvencí
 - Současná alternativa k microarrays



Hledání similarit

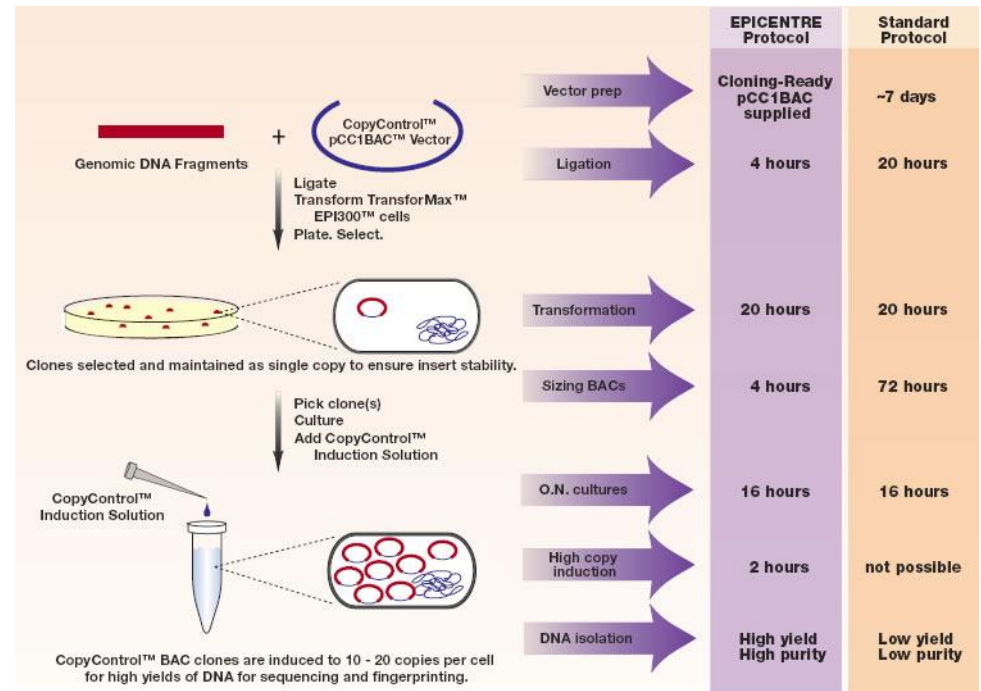
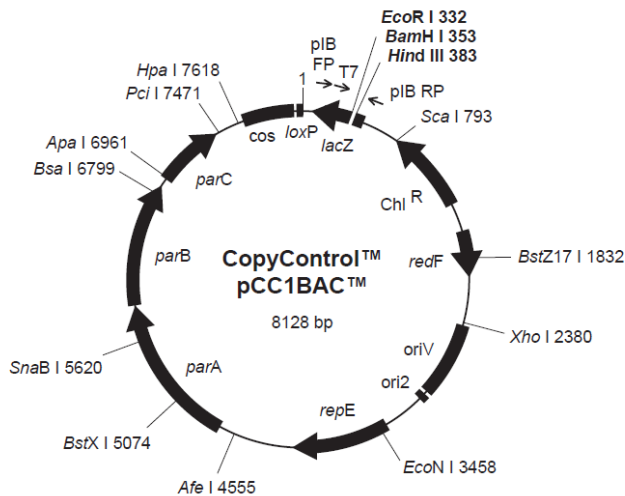
- Similarity, homology, statistika - bioinformatika
- Programy – BLAST, database genomů, database enzymů, mobilních elementů atd.
- Protein versus DNA sekvence

Konstrukce BAC a Fosmid knihoven

- Kultivačně nezávislé metody
- Konstrukce genomových knihoven s velkými inserty.
 - Vektory stabilní s velkými inserty
 - BAC a Fosmid – vektory
 - F origin,
 - Rozdíl v klonování a vpravení do *E. coli*
 - BAC – ligace přes restriční místa, transformace, elektroporace
 - Použití – izolované kultury – izolace DNA a její restrikce
 - Fosmid – blunt end a pakování pomocí fágového extraktů a transfekce
 - Metagenomické aplikace – izolace celkové DNA – fragmenty
- Screening jako macroarrays – mikrotitrační destičky, dot blots
 - Hybridizace, PCR, enzymové aktivity
 - Sekvence – sng
- Nevýhoda –
 - diskriminace klonů s „letálními geny“, repetitivními sekvencemi

Konstrukce BAC a Fosmid knihoven

- Příklady BAC: (Bacterial Artificial Chromosome)
- Např.: Epicentre –
 - CopyControl™ pCC1BAC™ Cloning-Ready Vectors (*Bam*H I, *Eco*R I, or *Hind* III)
 - Dva počátky replikace – jednokopiový z F plazmidu a indukibilní multikopiový

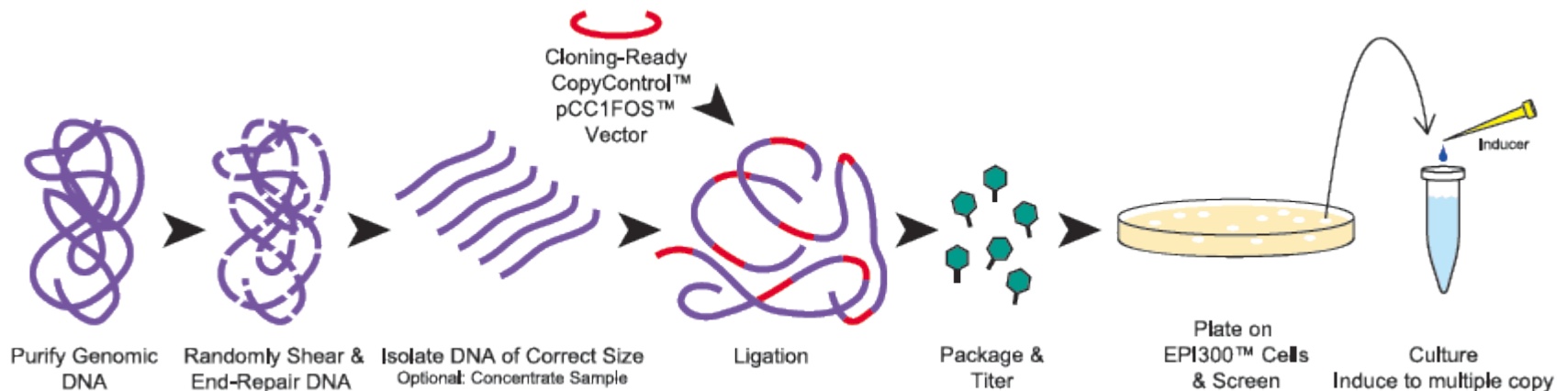
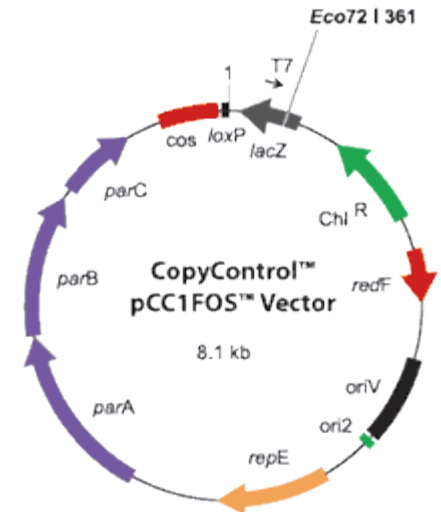


Konstrukce BAC a Fosmid knihoven

□ Příklady Fosmid:

■ Epicentre - CopyControl pCC2FOS™ Vector

- Dva počátky replikace –
jednokopiový z F plazmidu a indukibilní multikopiový
- 40-50 bp inserty – nutno PFGE kontrola



Struktura mikrobiální komunity

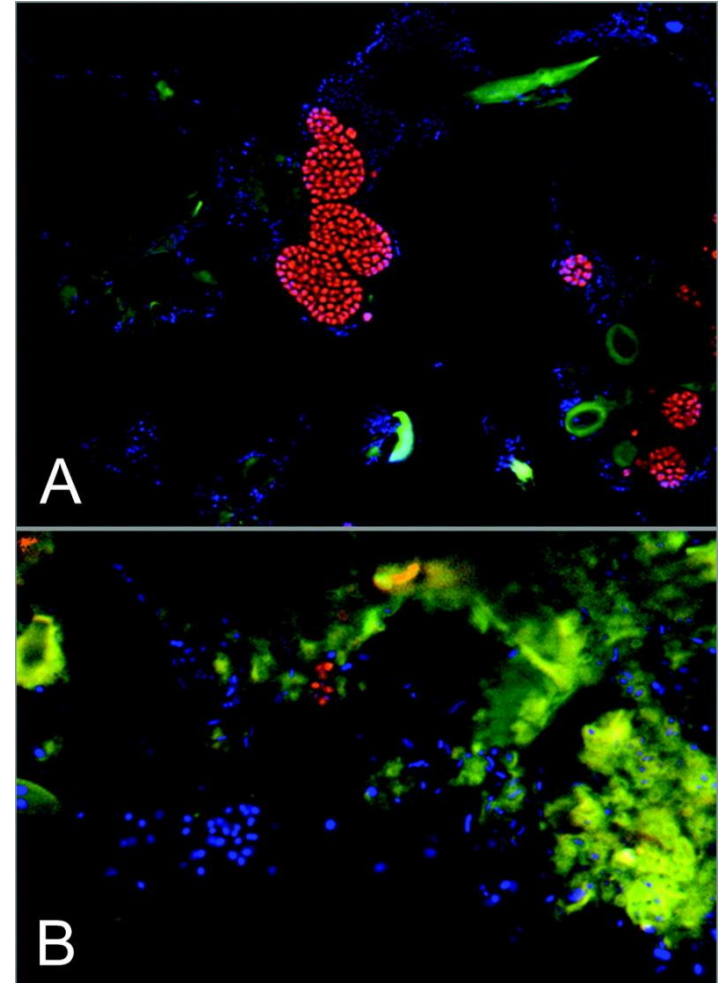
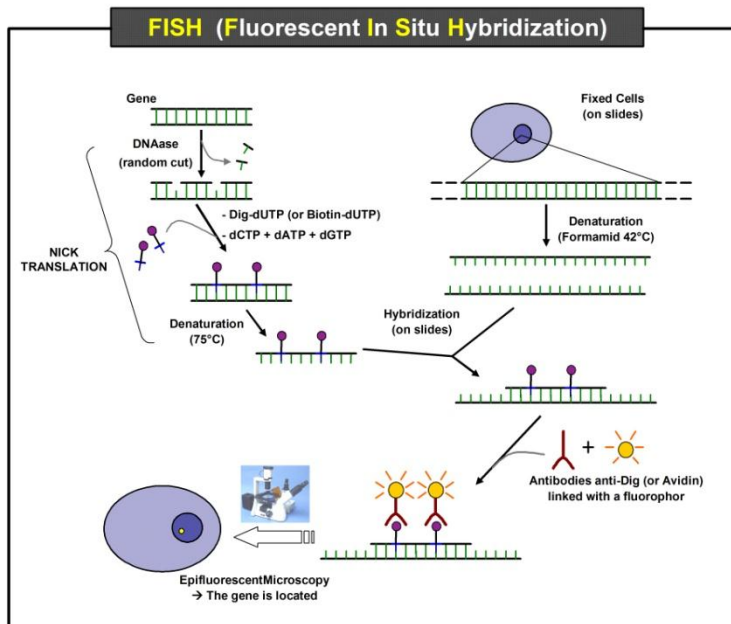
- Analýza genů a genomů obsažených v komunitě
 - PCR jednotlivých metabolicky zajímavých genů
 - PCR genů 16S RNA
 - Konstrukce klonálních knihoven, SNG
- Struktura a aktivita mikrobiální komunity
 - Probing intact cells (flurescent, radioaktivní)
 - Probing izolované RNA – metabolicky aktivní populace
 - Stanovení aktuální biomasy populace

In situ hybridizace (FISH)

- Identifikace jedné buňky v komunitě
- Fluorescentní detekce
 - Proby na rRNA bakteriální, rodově specifické, enzymové aktivity
 - Duální značení – rRNA a enzymová aktivita.
- Fixace mikrobiální populace
 - Zásadní a kritický bod pokusu
 - Zachování morfologie x permeabilizace buněk
 - Formaldehyd, alkoholy

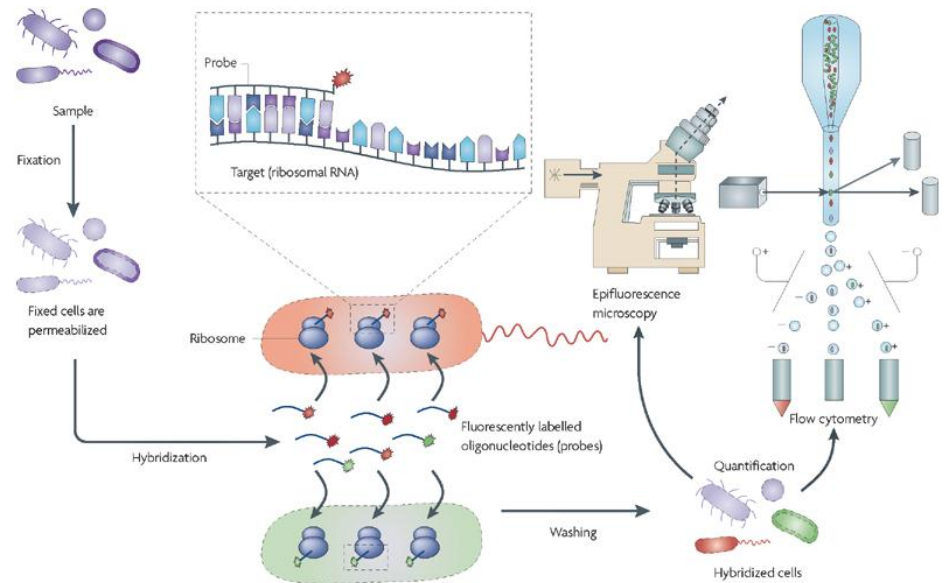
In situ hybridizace

- Schéma 1 – princip metody
- Schéma 2 – stanovení enzymové aktivity v environmentálním vzorku
 - ▣ Červené - *Ammonia oxidizers* - Neu23a



In situ hybridizace

- Isolace jedné buňky z komunity:
- rRNA probe – determinující – rod, kmen,
- Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence *in situ* hybridization techniques. **Rudolf Amann & Bernhard M. Fuchs**, *Nature Reviews Microbiology* **6**, 339-348 (May 2008)



Otázky ke zkoušce

- Co jsou a k jakému typu studií se používají v genetice a molekulární biologii reportérové geny, uveďte příklady typů (min. 4) a srovnajte možnosti jejich použití.
- Na modelu Lac operonu popište mutanty, které vykazují konstitutivní fenotyp dominantní k WT.
- Jaká je funkce CAP (CRP) proteinu v metabolismu *E. coli*? Jak se fenotypově chovají knock-out mutanty?
- Srovnajte možnosti transformace DNA u *E. coli*, *Bacillus*, *Pneumokoka* a *korynebacterií*.
- Jaké jsou typy regulací na úrovni RNA? Uveďte příklady a detailně popište u DsrA RNA a riboswitch).