



EVROPSKÁ UNIE
Evropské strukturální a investiční fondy
Operační program Výzkum, vývoj a vzdělávání



22. dubna 2020

Reg. č. projektu: CZ.02.2.69/0.0/0.0/16_015/0002362

METODY STUDIA DNA II

Přednáška k praktikům z molekulární biologie pro letní semestr 2020

Autor: kolektiv autorů pod vedením prof. MUDr. Petra Zacha, CSc. z Ústavu Anatomie 3. LF UK

Mgr. Petr Daniel

petr.daniel@lf3.cuni.cz

Primery (oligonukleotidy)

- ⦿ **Krátká jednořetězcová DNA** (18 – 30 nukleotidů)
- ⦿ Nasednutí (reasociace) primerů ovlivňuje teplota – je dána délkou primerů a obsahem nukleotidů

- ◉ **Přímý primer** a **zpětný primer** – každý se váže na 3' konec jednoho řetězce DNA
- ◉ Funkce:
 - > **Vymezují oblast DNA**, kterou potřebujeme amplifikovat
 - > **Místem iniciace syntézy komplementárního řetězce**
- ◉ Syntéza na zakázku, vložení nukleotidové sekvence, max. 200 nt
- ◉ GC = 40-60%
- ◉ Ne více než 4 stejné báze



Používané zkratky
bp = pár bazí
kbp = pár tisíce bazí
nt - nukleotid

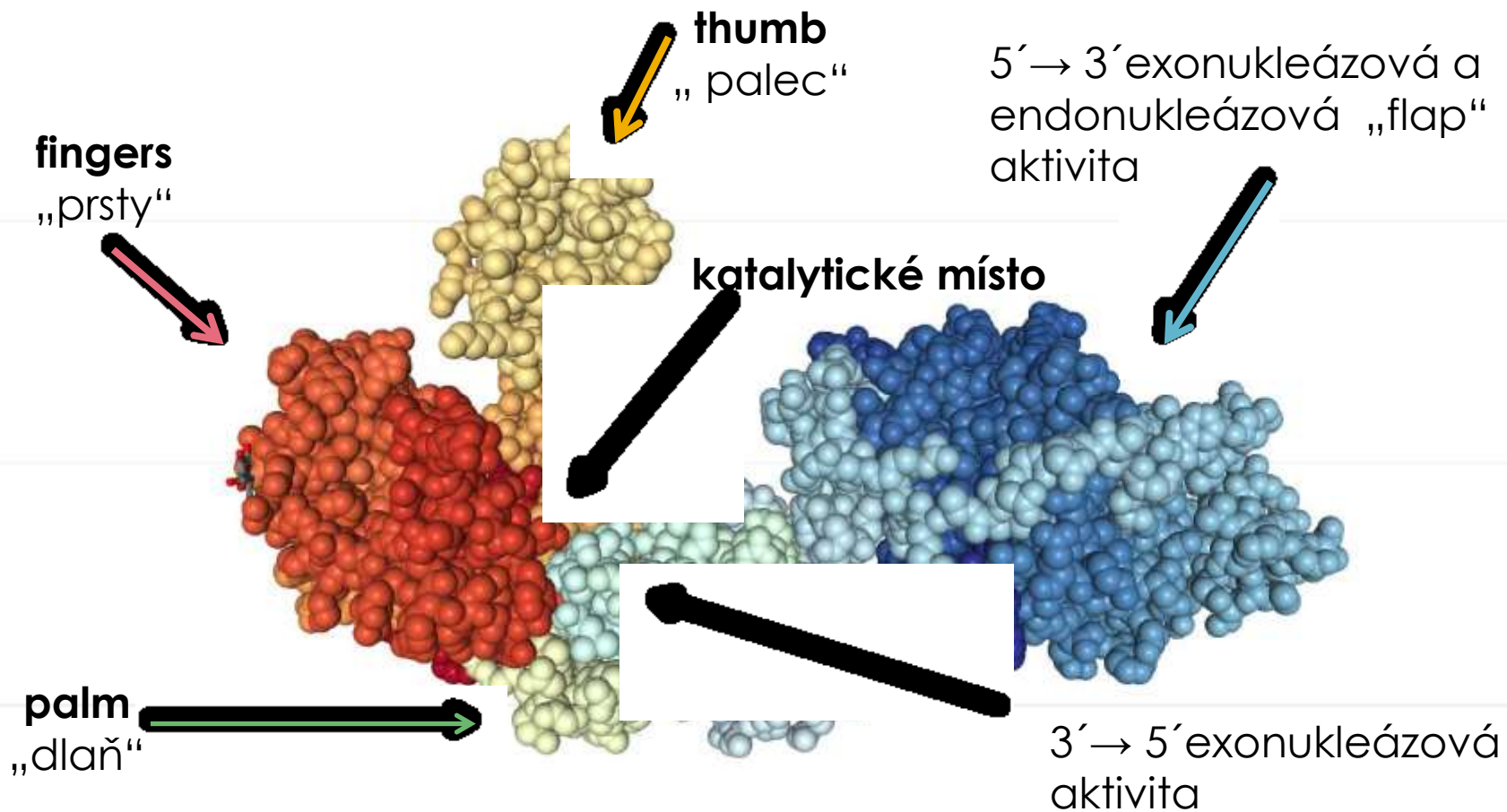
Termostabilní DNA dependentní DNA polymeráza

Taq polymeráza (*Thermus aquaticus*)

- ⊙ DNA-dependentní DNA „polymeráza“
- ⊙ **Vydrží vysoké teploty** (95°C – 40 min poločas rozpadu)
- ⊙ Katalytická aktivita 75°C
- ⊙ **Hot start Taq polymeráza** – protilátka
- ⊙ Vysoká procesivita (odpadne po 50 nt)
- ⊙ **Nemá korekční aktivitu (3' → 5' exonukleázová aktivita)**
- ⊙ Má 5' → 3' exonukleázovou aktivitu



- Má slabou terminální transferázovou deoxynukleotidylovou aktivitu (Tdt aktivita)



Palm doména (dlaň) – obsahuje katalytické místo

Fingers (prsty) – pozicování DNA

„proofreading“ - mutace

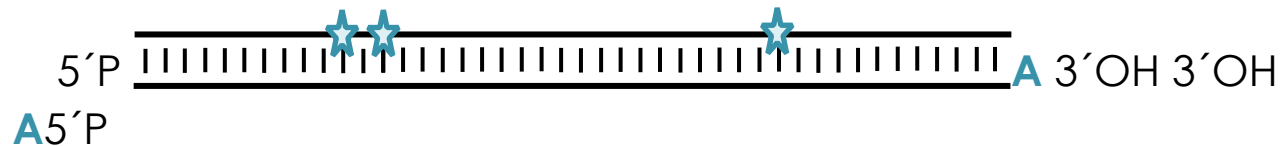
Model Taq polymerázy připomíná lidskou pěst

Thumb (palec) – vazba DNA

Exonukleázová doména – odstraňuje DNA (využití Taqman PCR)

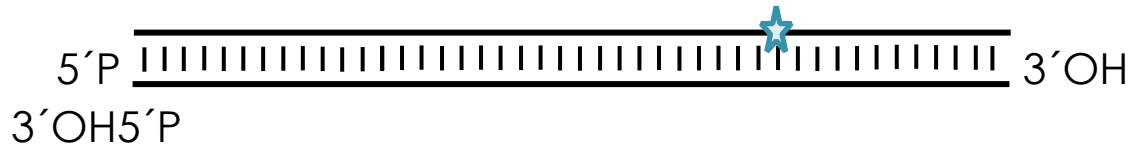
Termostabilní DNA dependentní DNA polymerázy

- ⊙ **Taq polymeráza** (slabá Tdt aktivita, specifická pro A)



finální produkt = dsDNA s přesahy, s mutacemi

- ⊙ **Pfu polymeráza** ($3' \rightarrow 5'$ exonukleázová aktivita zatupí konec produktu PCR)



finální produkt = dsDNA s tupými konci, méně mutací

☆ mutace

Volba polymerázy, Taq vs Pfu

Taq polymeráza

- ⦿ Vysoká chybovost umožňuje amplifikaci kratších úseků (do 2 kbp)
- ⦿ Výhodná cena
- ⦿ Vysoká procesivita - sekvenace
- ⦿ A-Přesahy

Pfu polymeráza

- ⦿ Nízká chybovost umožňuje amplifikaci delších úseků (více kbp)
- ⦿ Vysoká cena
- ⦿ Nižší procesivita
- ⦿ Produkt nemá A-přesahy

Pyrococcus furiosus DNA polymerase (2.8×10^{-6})

Taq DNA polymerase (2.28×10^{-5})

Number of PCR cycles

Calculate error

Estimated percentage of PCR products having an error (i.e., DNA molecules with 1 error):

Length of PCR product in bp:

Number of PCR cycles:

Example

What percent of the product molecules contain an error after PCR (30 cycles) with different polymerases?

Polymerase	1 kb template	3 kb template
Phusion High-Fidelity DNA Polymerases (HF Buffer)	1.32%	3.96%
Phusion High-Fidelity DNA Polymerases (GC Buffer)	2.85%	8.55%
<i>Pyrococcus furiosus</i> DNA polymerase	8.4%	25.2%
<i>Taq</i> DNA polymerase	68.4%	205.2%

The table above demonstrates the low error rate of Phusion DNA Polymerase. After 30 cycles of PCR amplifying a 3 kb template, only 3.96 % of the product DNA molecules contain 1 (nucleotide) error each. This means that 96.04 % of the product molecules are entirely error-free. In contrast, after the same PCR protocol performed with *Taq* DNA polymerase, every product molecule contains an average of 2 errors.

PCR (polymerázová řetězová reakce)

In vitro syntéza (amplifikace, namnožení) vybraného úseku dsDNA)

Reakce probíhá **v cyklech** (30 – 45 cyklů)

Každý cyklus má **3 kroky** (změna teploty je řídicí konstanta ovlivňující jednotlivé kroky)

- **denaturace**
- **annealing** (reasociace)
- **extenze**

Kroky PCR

1. Denaturace

- Porušení H-můstku v dvoušroubovici DNA za vzniku separátních vláken ($T > 94^{\circ}\text{C}$)

2. Annealing (reasociace)

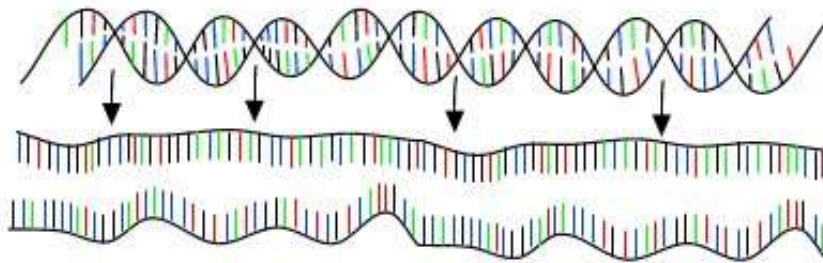
- Připojení primerů k odděleným vláknům DNA ($T_{\text{anneal.}} = ?$), cca 5°C méně než melting teplota

3. Extenze (elongace)

- Prodlužování, syntéza nového vlákna DNA pomocí DNA polymerázy podle starého vlákna jako templátu ($T = 72^{\circ}\text{C}$)

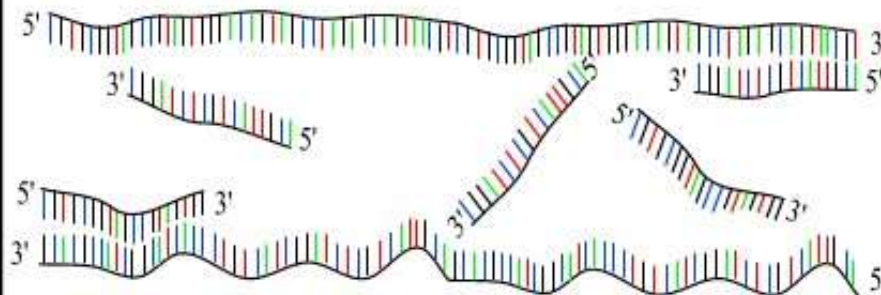
PCR : Polymerase Chain Reaction

30 - 40 cycles of 3 steps :



Step 1 : denaturation

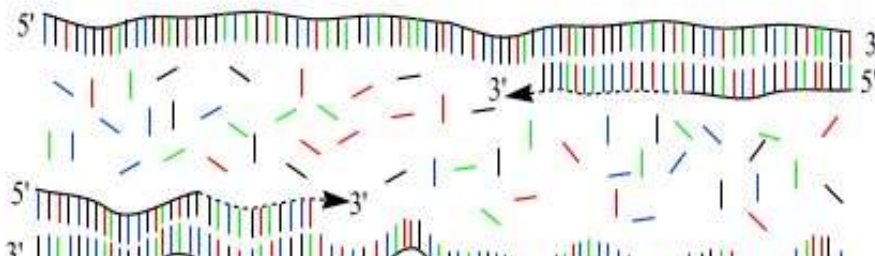
1 minut 94 °C



Step 2 : annealing

45 seconds 54 °C

forward and reverse primers !!!



Step 3 : extension

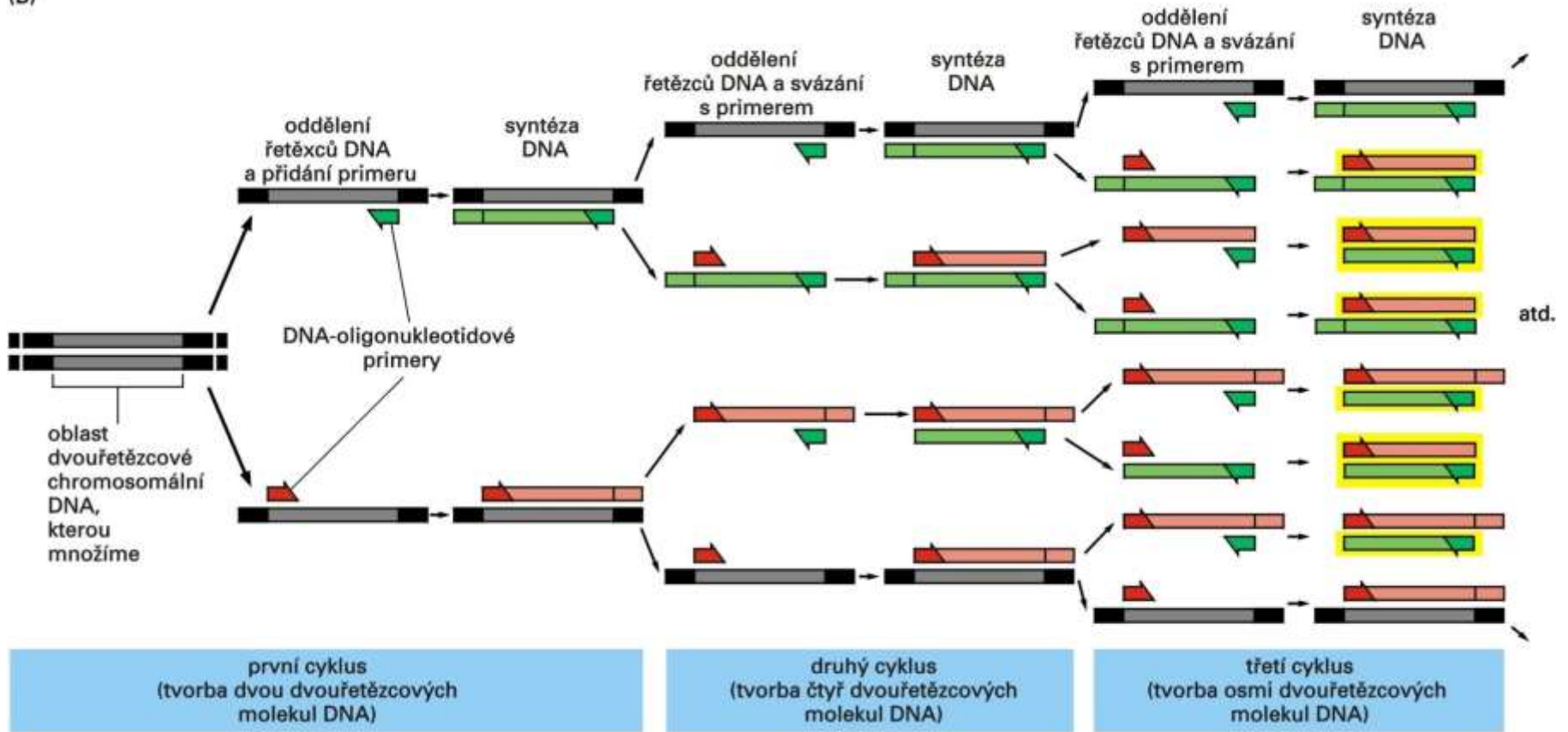
2 minutes 72 °C
only dNTP's

Amplifikace

- ◎ **Exponenciální průběh**

- > Počet kopií množeného úseku DNA = 2^n , kde n je počet cyklů

(B)



Výchozí stav

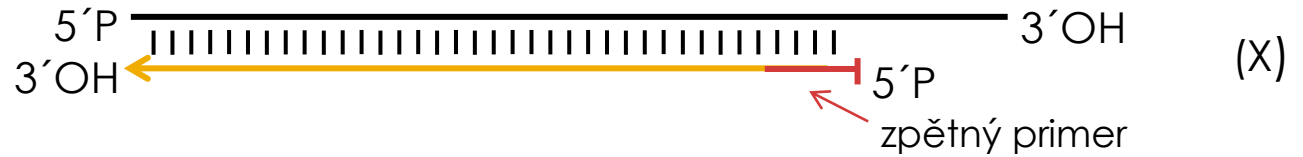
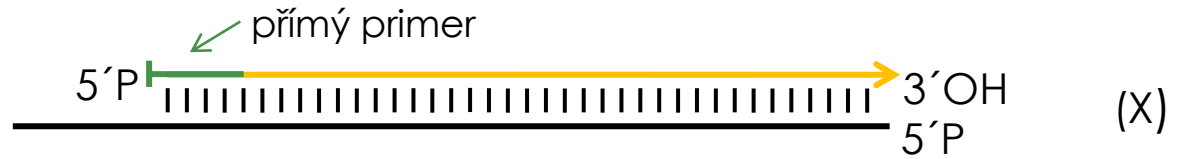
1 molekula dsDNA 3'OH 5'P



Konec

1. cyklu

2 molekuly X

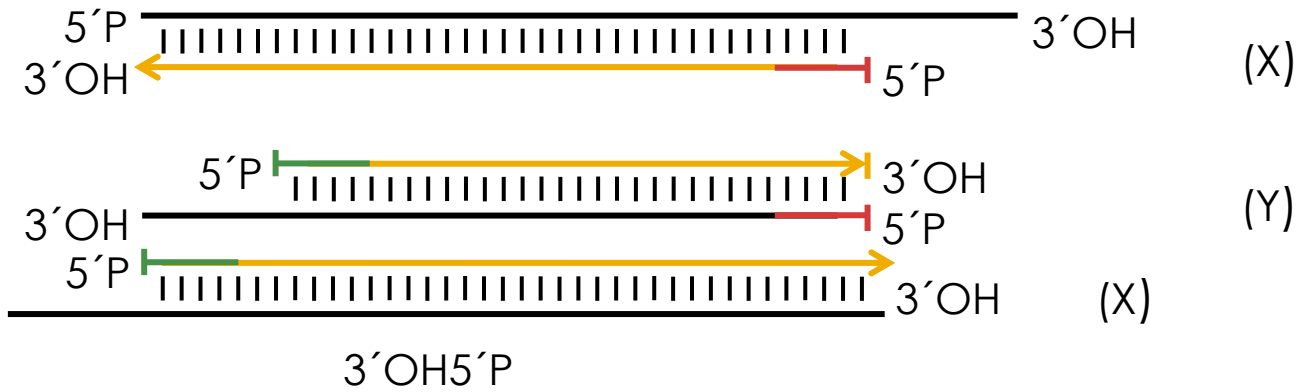


Konec

2. cyklu

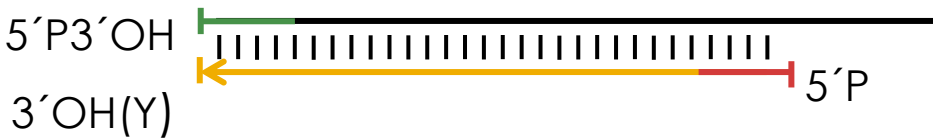
2 molekuly X
2 molekuly Y

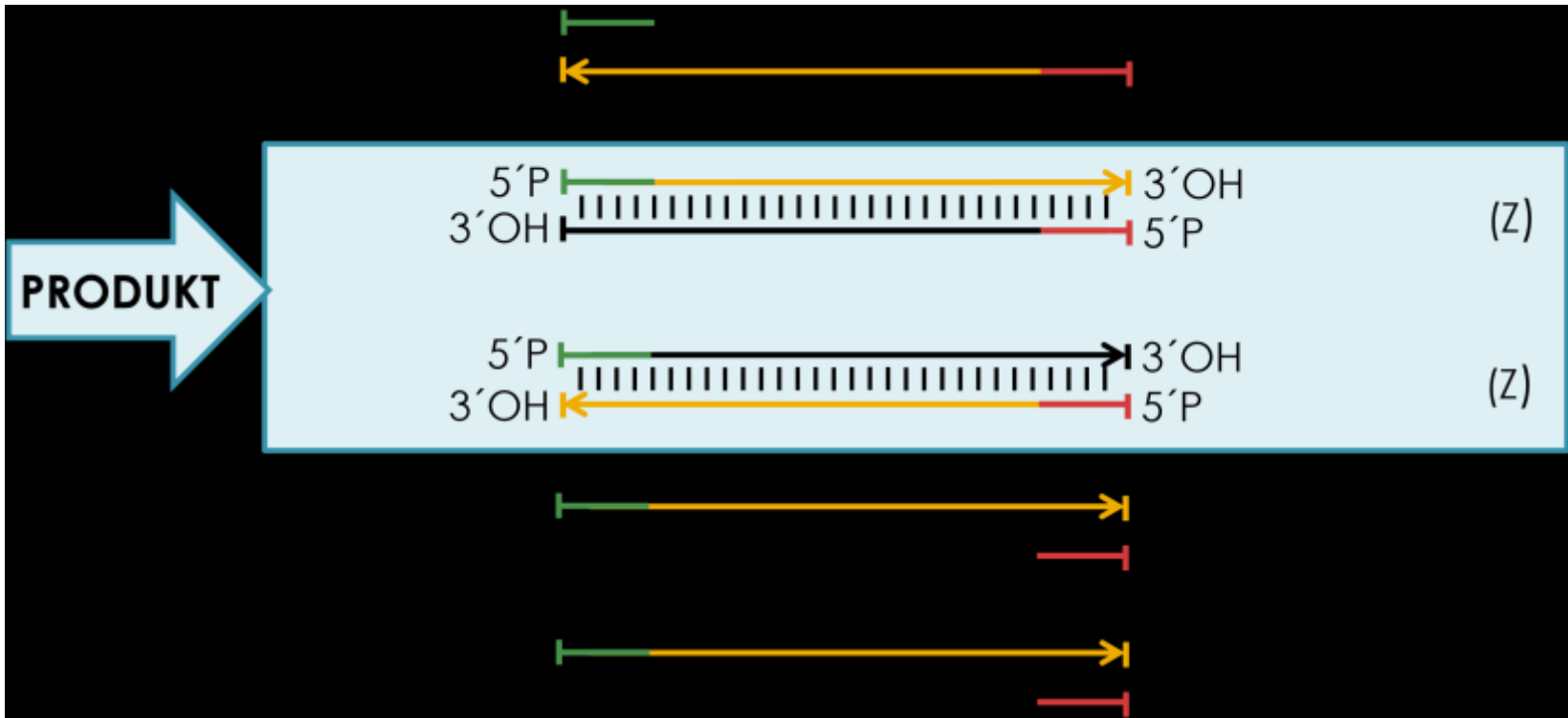




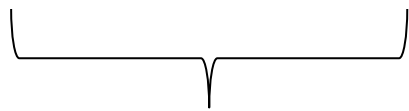
Konec
3. cyklu

- 2 molekuly X
- 4 molekuly Y
- 2 molekuly Z





		5'P3'OH
3'OH(X)		5'P
počet molekul meziproduktu a produktu v reakci při	daném cyklu (n = počet cyklů)	X Y Z
	2	2n-2 2 ⁿ -2n



2_n

můžeme zanedbat

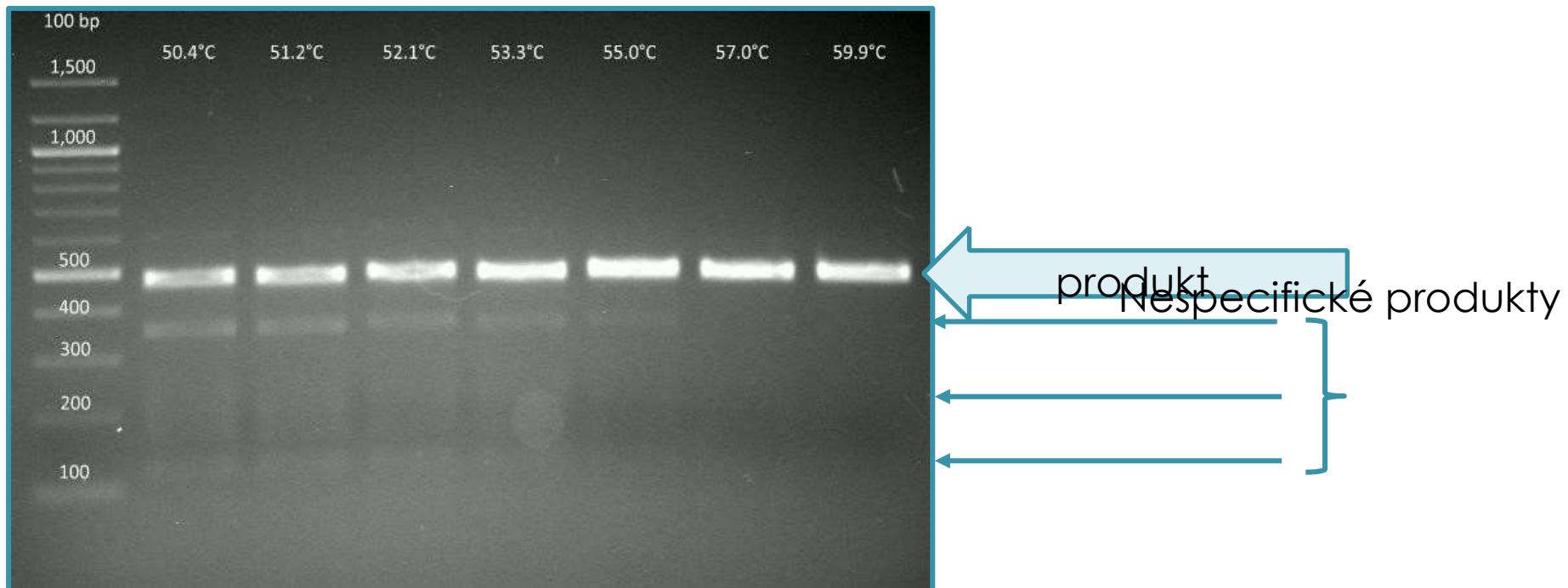
(platí pro velké n)

Cyklus PCR	Počet molekul X (templát)	Počet molekul Y	Počet molekul Z
1	2	0	0
2	2	2	0
3	2	4	2
4	2	6	8
5	2	8	22
10	2	18	1004
30	2	58	1,073,741,764

konstantní lineárně exponenciálně

Vizualizace produktu PCR

- **Optimalizace podmínek PCR – teplota**
 - > Zvýšením teploty se zvyšuje specifita reakce
 - > Exon 4 genu BRCA1



Závěrečná fáze PCR

- ⦿ Trvání extenze posledního cyklu se prodlužuje na 5 min
- ⦿ Ukončení reakce
 - EDTA – chelatační činidlo pro Mg^{2+}
 - (EGTA – Ca^{2+})
- ⦿ Uchovávání vzorku na ledu/mrazák
- ⦿ Následuje analýza gelovou elektroforézou



Nastavení PCR

Úvodní denaturace (95°C, 2 minuty)





Denaturace

(95°C, 15-30 sec)

Annealing

(50-60°C, 15-30 sec)

Extenze (72°C, 1kb/min) **30-45 x** ↓

Závěrečná extenze (72°C, 5 min)

Tepelný cyklér – přístroj na PCR



Typy PCR

◎ PCR s alelově specifickými primery

(**ASO-PCR** = PCR s alelově specifickými oligonukleotidy)

- > cílená analýza
- > rozpoznávají místo mutace
- > analýza mutace $\Delta F508$ v genu *CFTR* – praktika

◎ PCR s obecnými primery

- > následuje analýza PCR produktu
- > cílená, kompletní analýza
- > analýza mutací *H63D* a *C282Y* v genu *HFE* – praktika

Varianty PCR – NESTED PCR

○ Nested PCR, seminested PCR

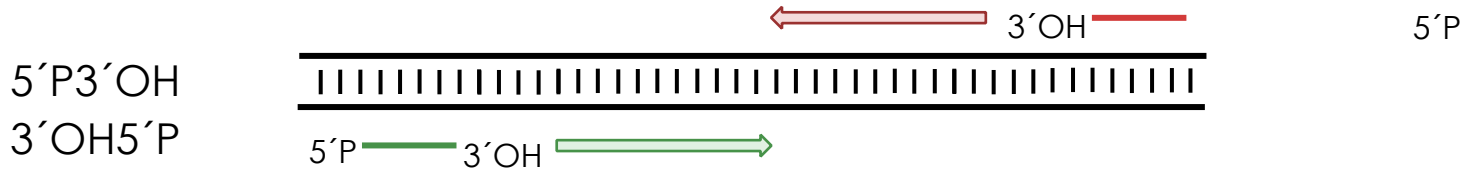
> zahrnuje **dvě po sobě následující reakce PCR**

(produkt 1. reakce PCR je použit jako templát pro 2. reakci PCR)

> snižuje riziko nespecifického nasedání primerů

○ pár modrá+žlutá nasedá i na jiná místa v bun.

DNA

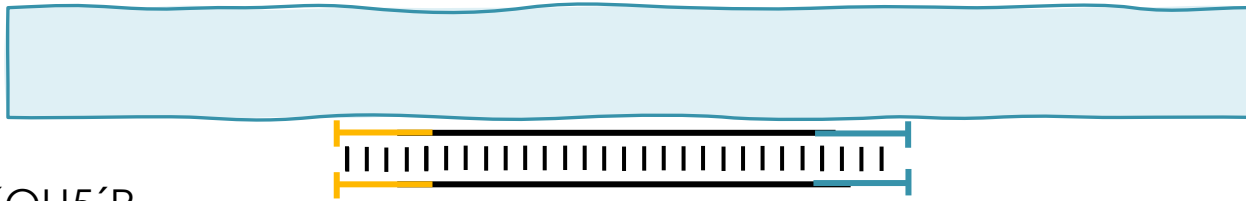


1. PCR



2. PCR

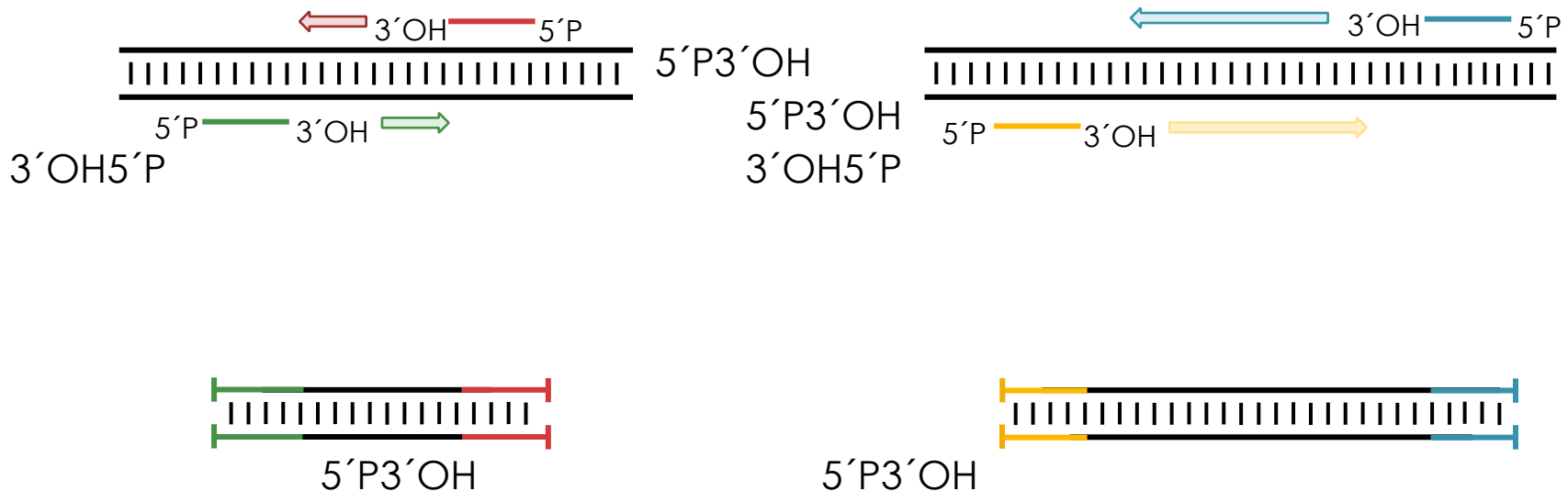
5'P3'OH
3'OH5'P

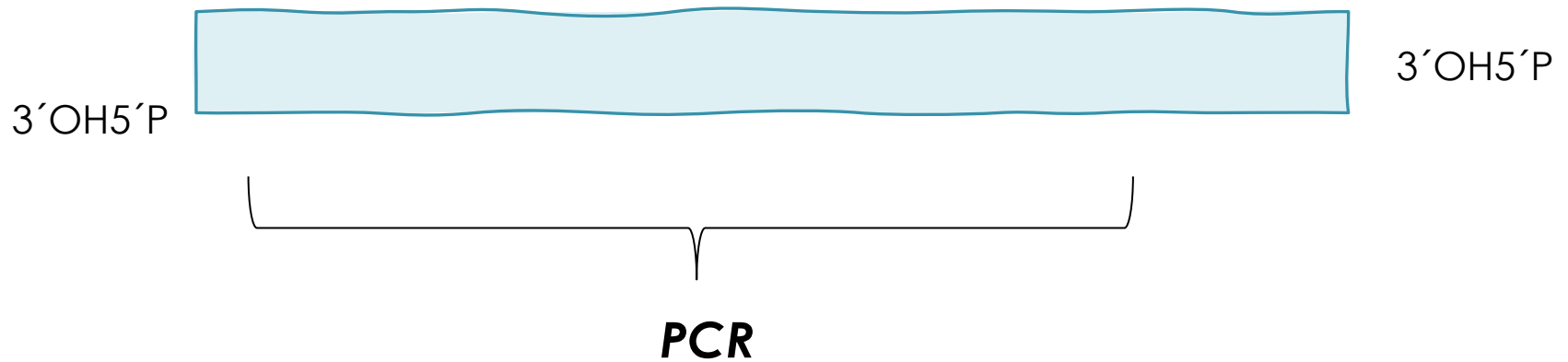


Varianty PCR – MULTIPLEX PCR

⊙ Multiplex PCR

- > Dvě nebo více PCR probíhají v jedné reakční směsi ve stejném čase
- > 2 páry primerů → 2 produkty PCR (musí být rozdílné velikosti)





Analýza PCR produktu

Neznámá mutace – kompletní analýza


◎ Sekvenování

- > hledání kompletního (přesného) pořadí nukleotidů v amplifikovaném úseku DNA

Známa mutace – cílená analýza

◎ Hybridizace

- > PCR produkt analyzujeme pomocí značené sondy

- 
- ◎ **RFLP (polymorfismus délky restričních fragmentů)**
 - > PCR produkt specificky štěpíme pomocí restričních enzymů (restriční endonukleáza – restriktáza)

 - ◎ **Sekvenování**

Následující informace jsou nad rámec učiva této přednášky, a jsou obsaženy v audioprezentaci č. 3.

Osnova:

Typy PCR – bisulfitová PCR

- RACE
- RT-PCR metoda analýzy RNA
- SYBR Green
- TaqMan Assay
- detekce koronavirů

Sekvenace DNA

- Metoda Sangerova
- Metody NGS
- Illumina sekvenování
- Pyrosekvenování (454 sekvenování)
- Ion Torrent sekvenování
- Metody 3. generace - Metody 4. generace

Odkazy

Další varianty PCR – bisulfitová PCR

- Stanovení methylace CpG
- DNA se inkubuje s bisulfátem sodným
- Nemethylovaný cytosin konvertuje na uracil, zatímco 5methylcytosin zůstává nezměněn

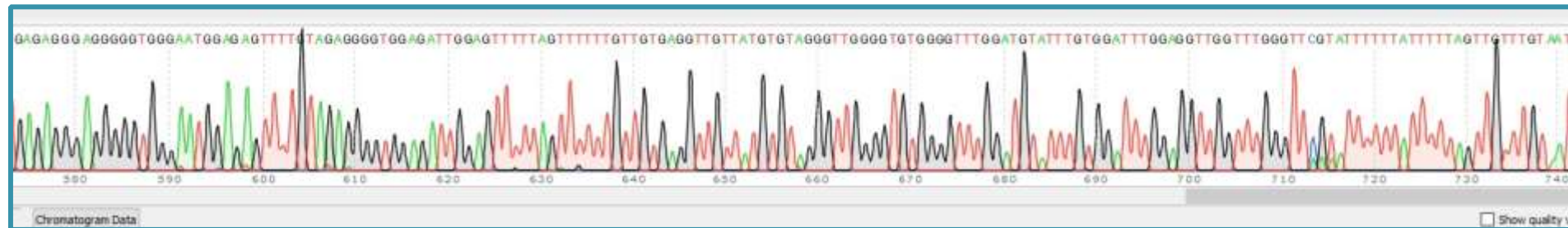
m

5'- ATAC**CG**ACAAATT**CG**GATACCA - 3' ↓

konverze

5'- ATAC**CG**AUAAATT**UG**GATAUUA - 3' ↓ PCR

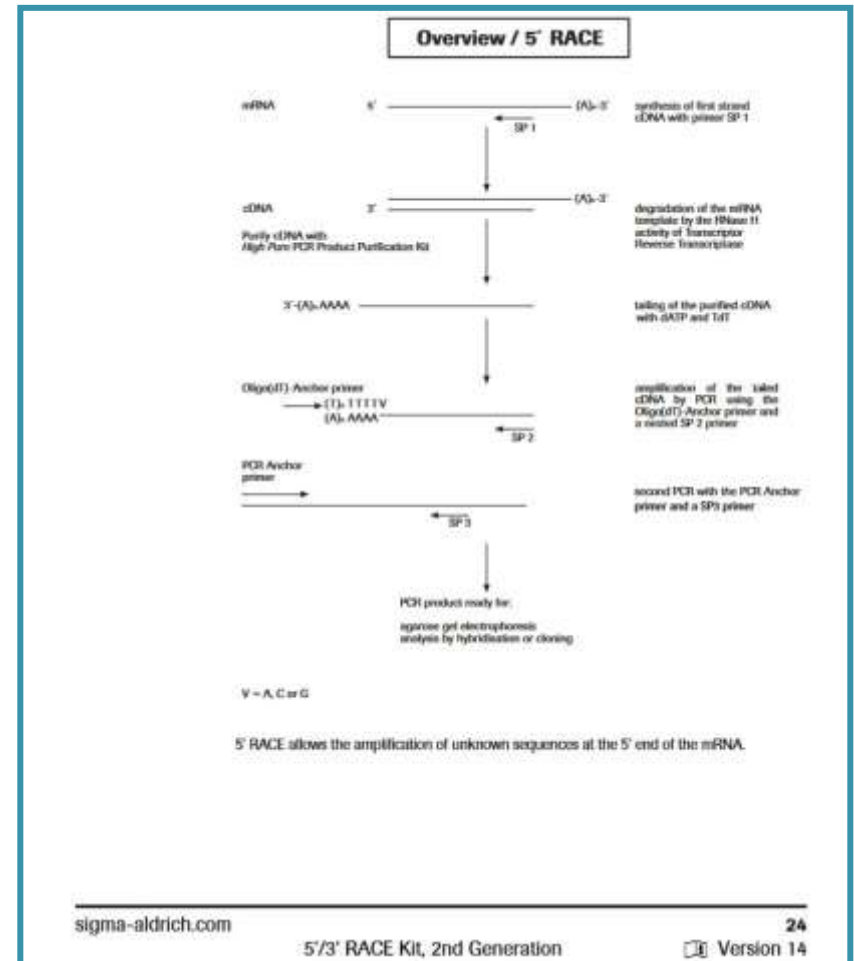
5'- ATAC**CG**AUAAATT**TG**GATAUUA - 3'



Další varianty PCR – RACE PCR

- Stanovení začátku nebo konce transkriptu

- Templátem je tzv. komplementární DNA (cDNA) = přepis mRNA reverzní transkriptázou
- 3'RACE PCR** – využívá toho, že na 3'konci transkriptu je poly A sekvence, jednodušší
- 5'RACE** – připojení adaptéru na 5'konec transkriptu (slouží pro nasednutí přímého primeru)



Další varianty PCR – Real-time PCR (qPCR)

- **Stanovení relativního množství mRNA konkrétního genu**
 - Stanovení množství produktu po každém proběhlém cyklu PCR
 - Postup:
 - > **Izolace RNA** (celkové, nebo jen mRNA)
 - > **Reverzní transkripce** pomocí virové reverzní transkriptázy, vznik cDNA
 - > **qPCR**
- Pokud není gen exprimován, nevzniká mRNA, nevzniká produkt PCR
- **Relativní hladina genu se stanoví porovnáním s hladinou tzv. housekeep genu** (např. GAPDH, TUB, HPRT, RPL30)

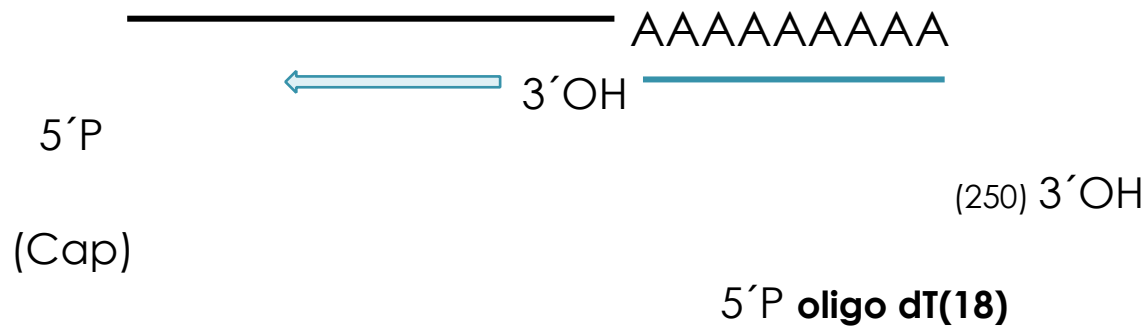


- ⦿ PCR produkt do 200 bp a méně
- ⦿ Design primerů – hranice exon-intron

Světelný cyklér

Reverzní transkripce

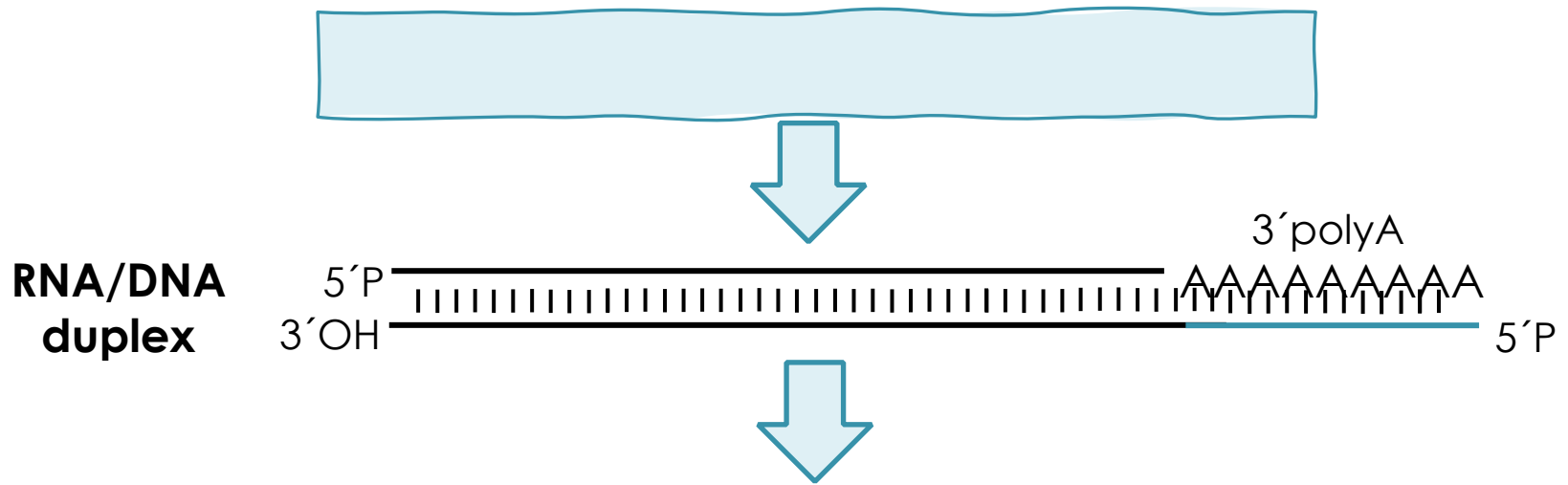
⊙ Syntéza 1. řetězce cDNA



⊙ Primer – 3 možnosti:

- > oligodT(18) – přepis selektivně jen mRNA
- > náhodné hexamery – vhodný pro qPCR
- > spec. primery – slabě exprimované mRNA

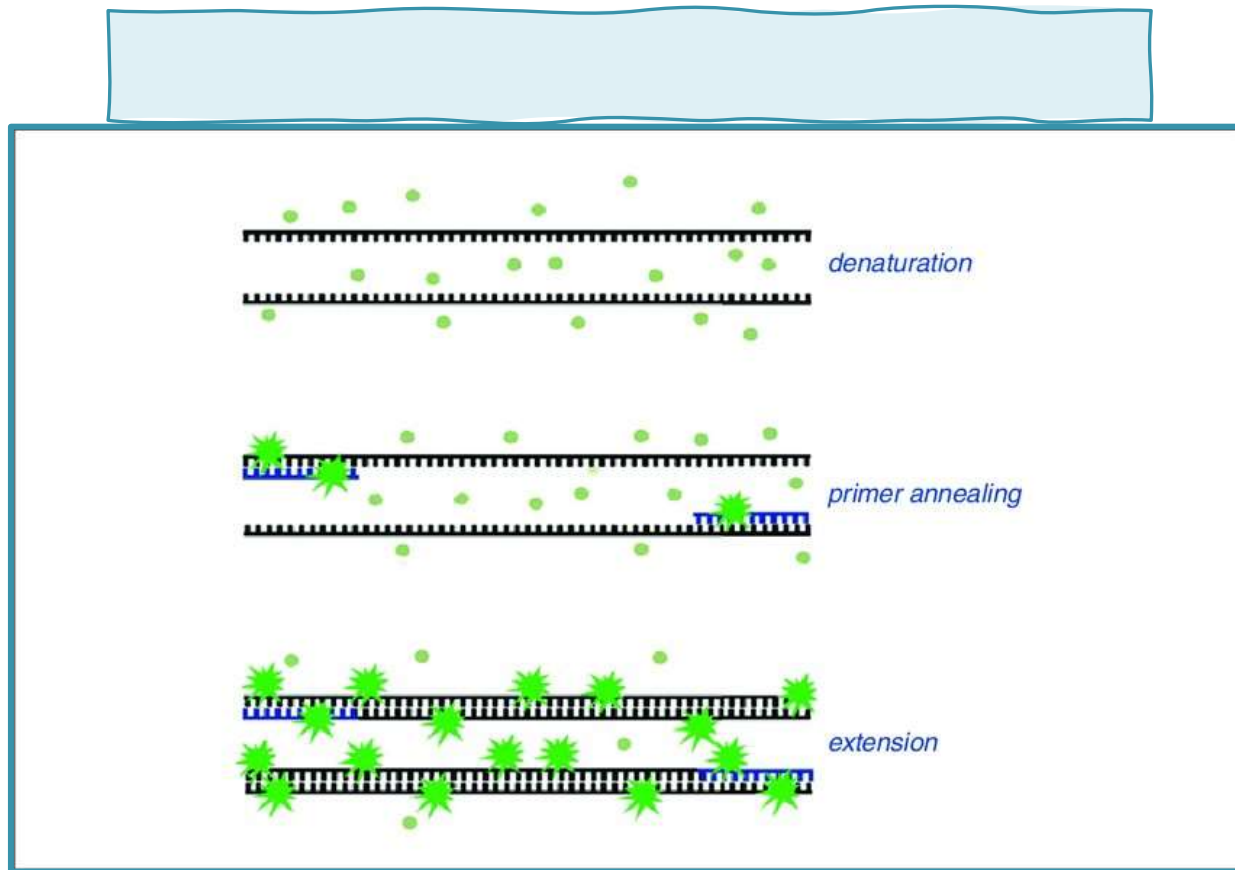
M-MLV reverzní transkriptáza (RNase H minus), 55°C



klasická PCR – teplotem pouze DNA řetězec

qPCR – SYBR Green I

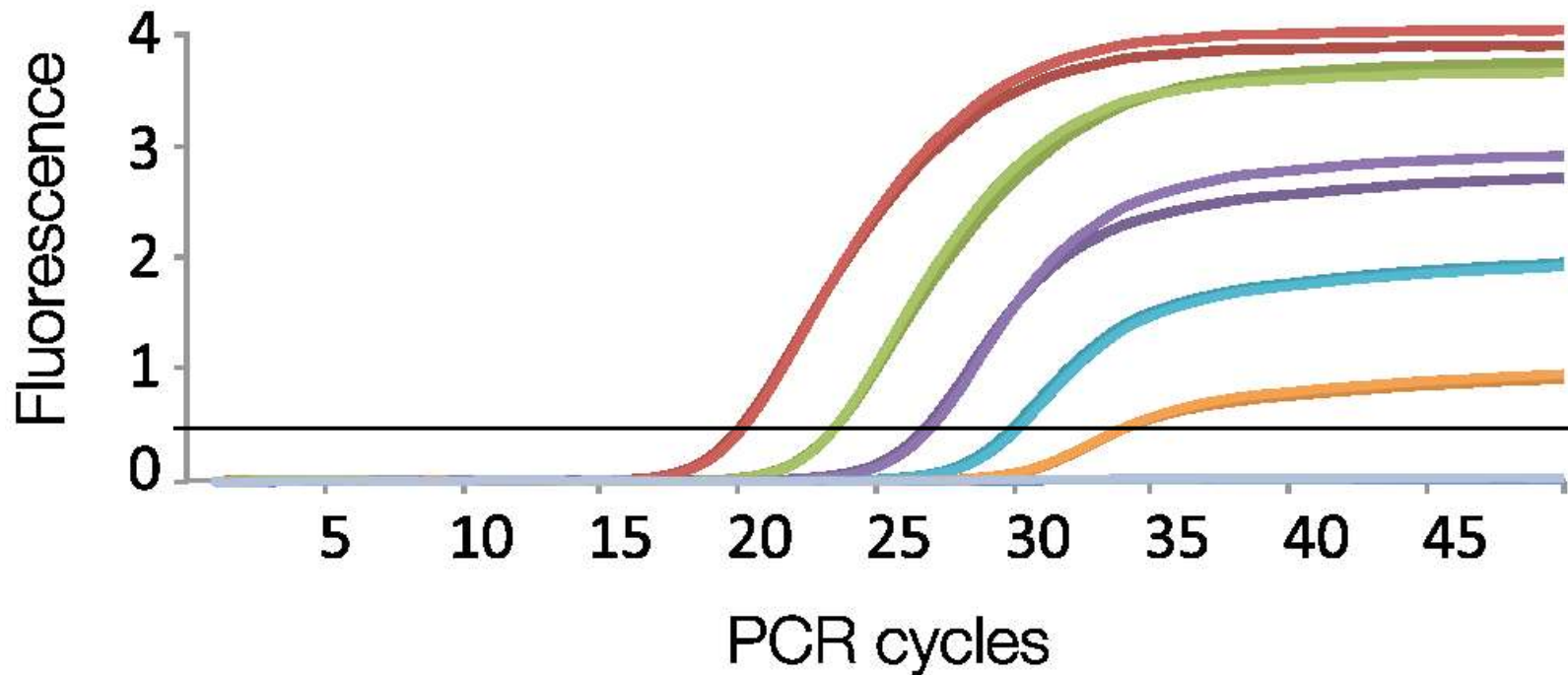
- Reakce obsahuje fluorescenční barvivo SYBR green I
- Vazba do malého žlábků dsDNA
- Samotné nefluoreskuje
- Vazbou stoupne fluorescence při 530 nm



qPCR – SYBR Green I

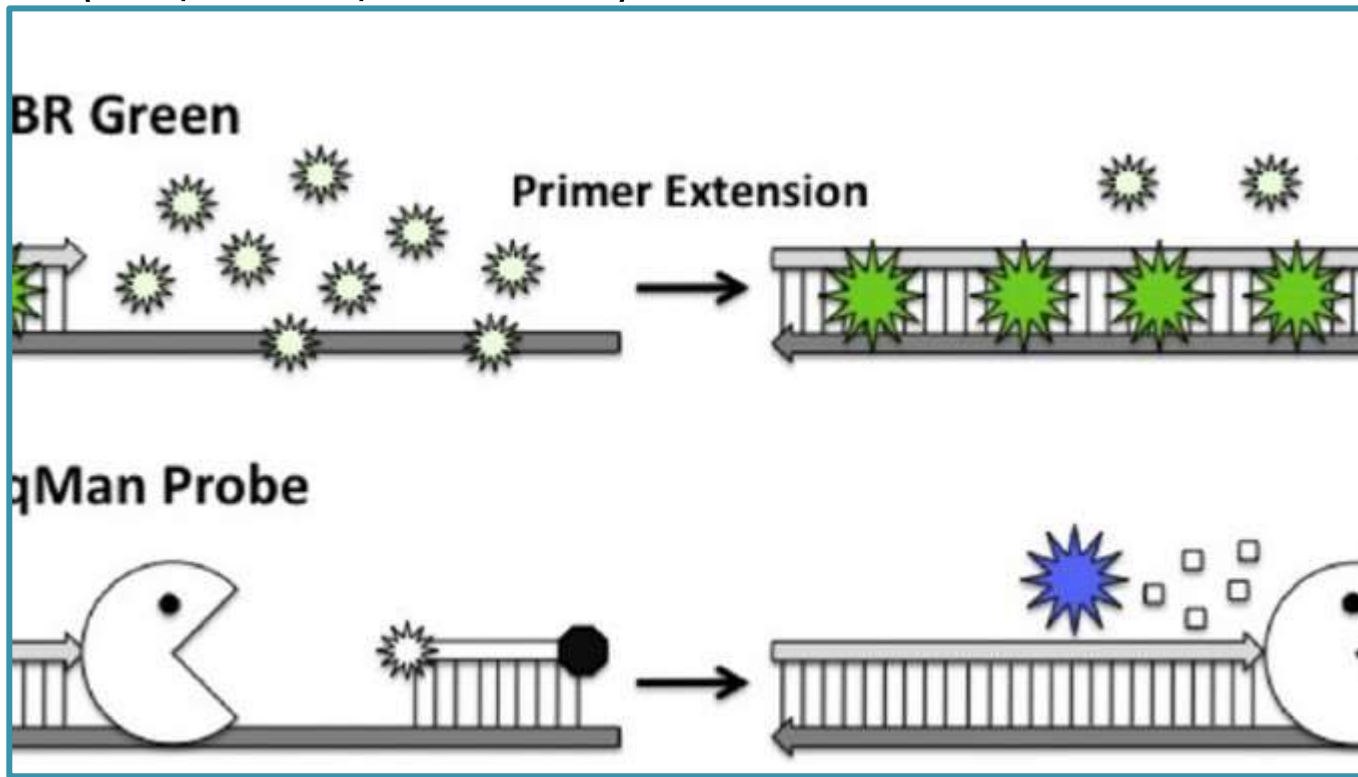
- ⦿ Expresse genů – silná exprese – cca 20 cyklus
- ⦿ Artefakty – po 30. cyklu, např. rezidua DNA

probe-based qPCR assay, NONO mRNA,
total RNA dilution series: 100 - 0.01 ng/reaction



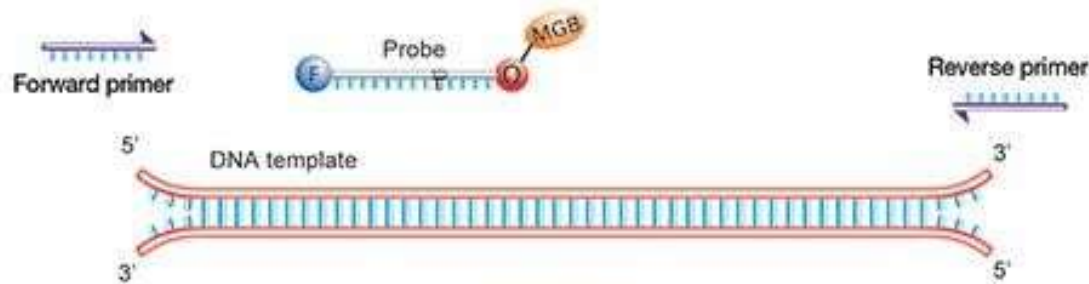
qPCR – SYBR Green I versus TaqMan

- Cena (více vzorků – SYBR Green I)
- Kvalita (TaqMan vyšší kvalita)

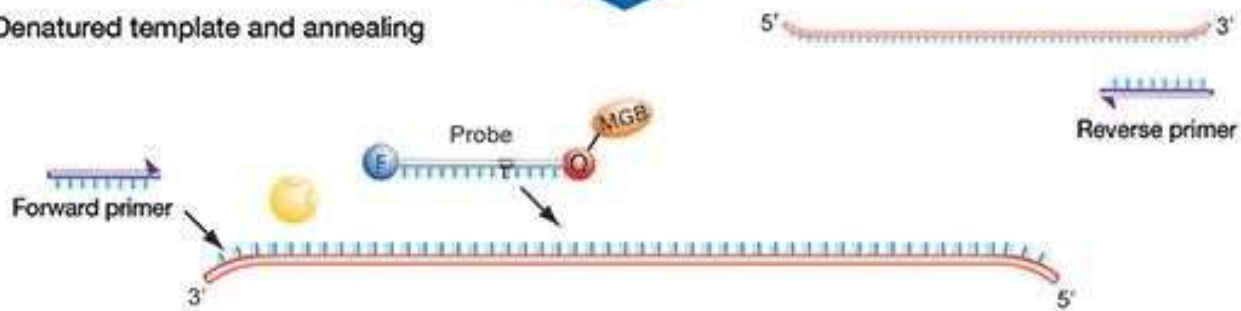


Taqman PCR

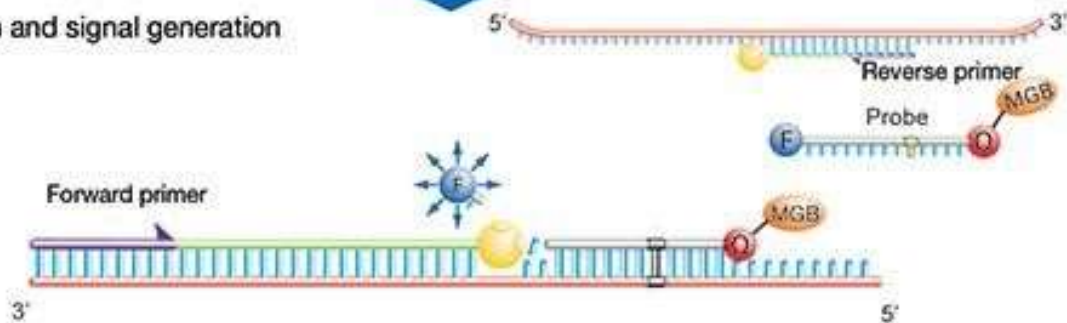
1. Assay components and DNA template



2. Denatured template and annealing



3. Polymerization and signal generation

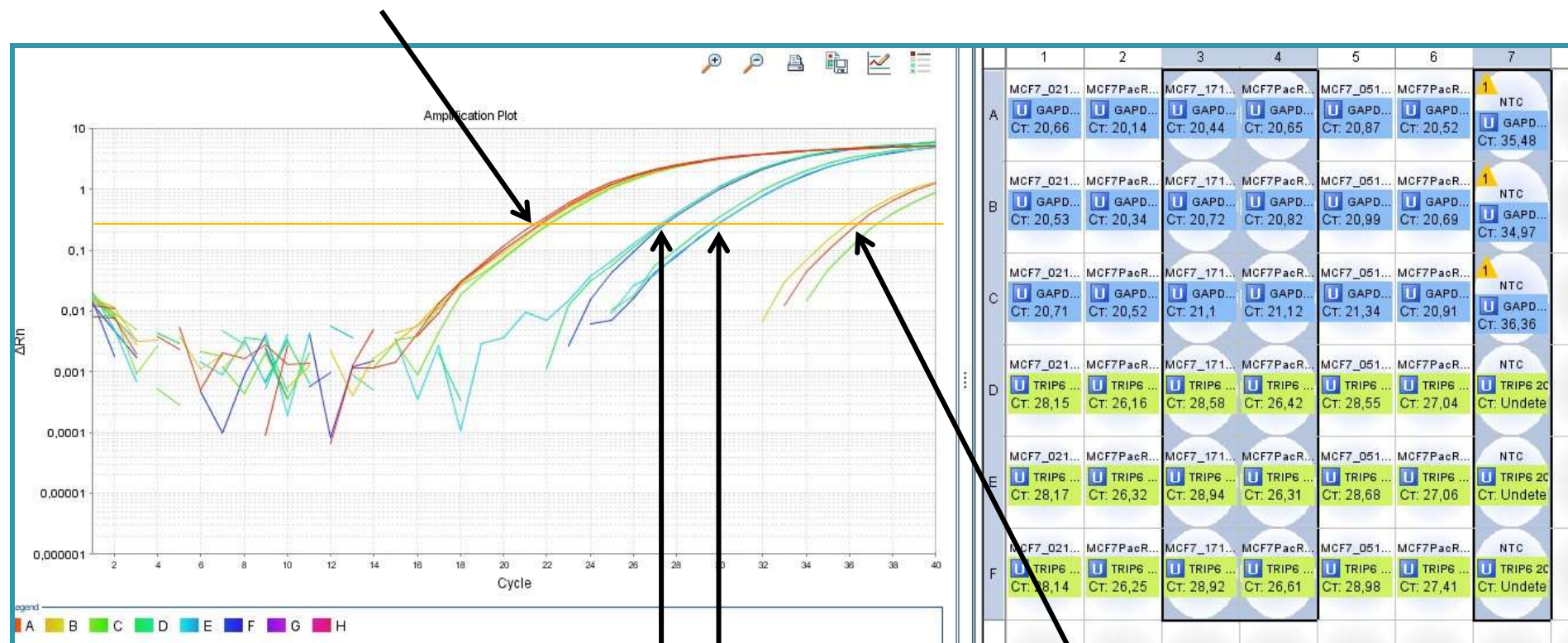


Legend

- F** Applied Biosystems™ FAM™ or VIC™ dye
- Q** Nonfluorescent quencher (NFQ)
- MGB** Minor groove binder
- Applied Biosystems™ AmpliTaq Gold™ DNA Polymerase**
- Probe**
- Primer**
- Template**
- Newly synthesized DNA**

Taqman PCR

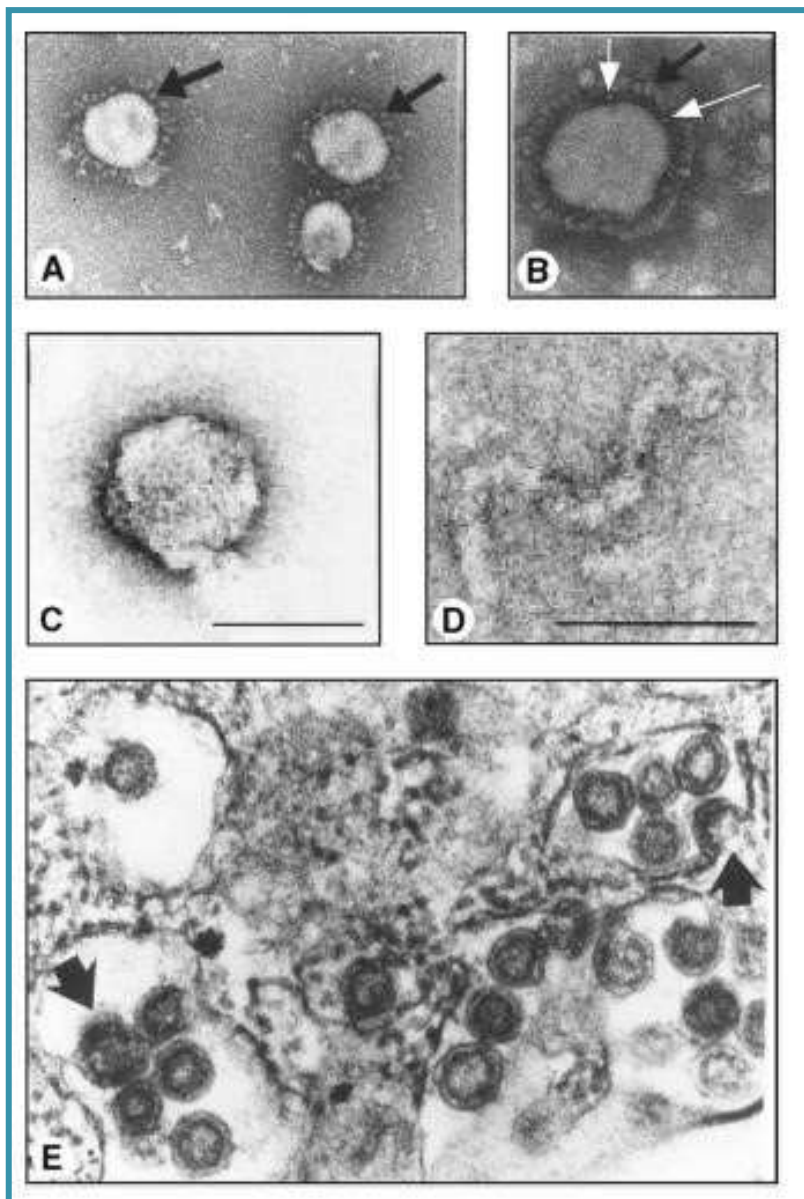
- ⦿ Křivky GAPDH, 21. cyklus (pro oba vzorky stejná)



⦿ Křivky TRIP6, pro vzorek 1 (27. cyklus),
vzorek 2 (29. cyklus)

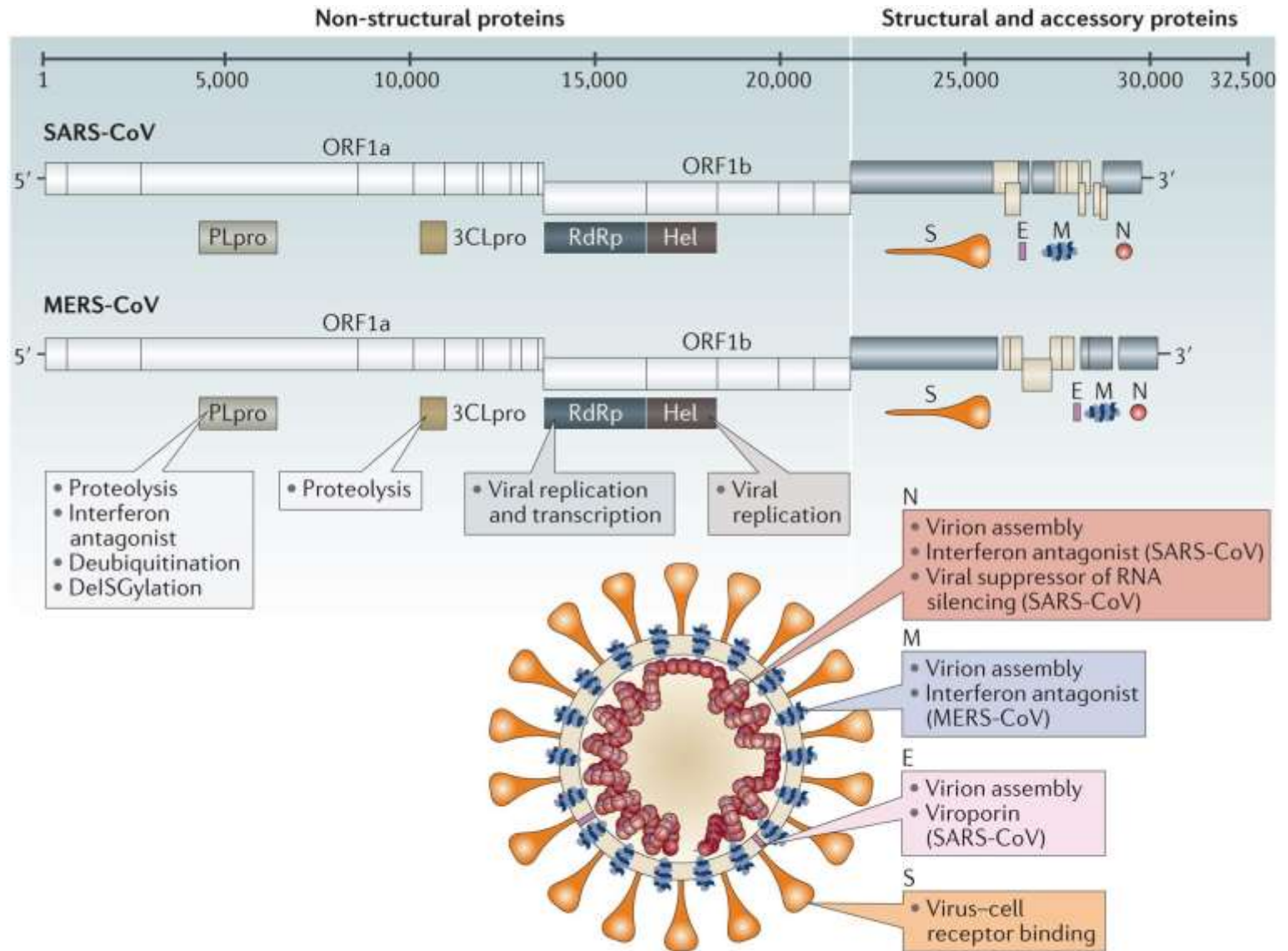
⦿ Kontrola kvality
vzorků – exprese
DNA, cca 35.
cyklus

Coronaviridae

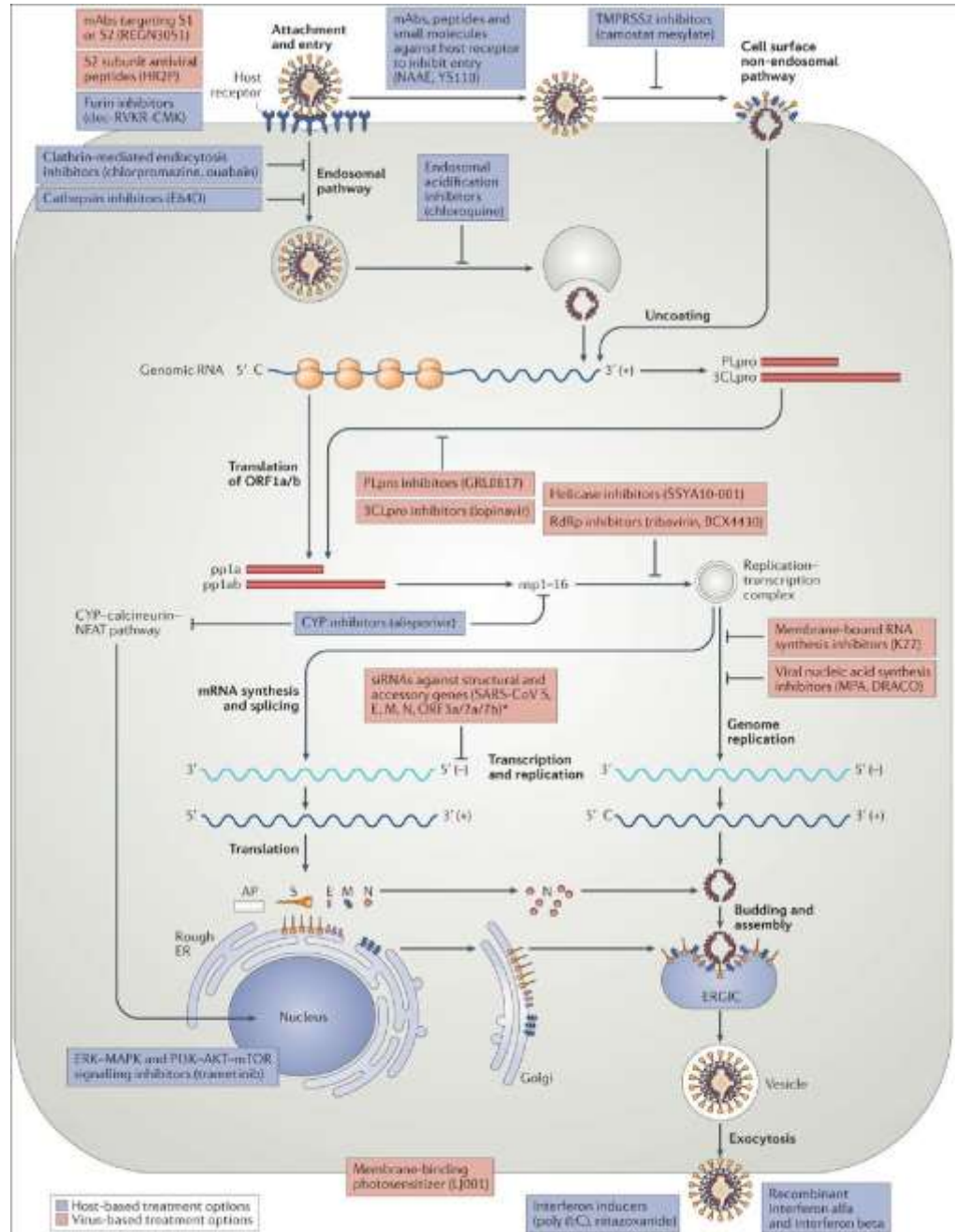


- Životní cyklus probíhá v cytoplazmě
- Strategie polyproteinu a subgenomových mRNA
- Genom: 30 kb, +ssRNA (5' cap, 3' polyA)
- Genomová RNA je infekční!
- Replikace virem kódovanou RNA dependentní RNA polymerázou (RdRP)

Figure 36.1 Morphology of coronaviruses. Human respiratory coronavirus HCoV-OC43 (original magnification, $\times 90,000$) (A) and turkey enteric coronavirus TCoV (B) in negatively stained preparations. The large, petal-shaped spikes (*black arrows*), composed of the S glycoprotein, seen on the envelopes of both viruses distinguish coronaviruses from other enveloped viruses. Some coronaviruses also exhibit a fringe of shorter spikes composed of the hemagglutinin-esterase glycoprotein (*white arrows*). (C) Internal core of porcine transmissible gastroenteritis virus (TGEV). The core was obtained after removal of envelope by treatment with NP-40 and appears to have a spherical symmetry. (D) Helical nucleocapsid released from the TGEV core structure by Triton X-100 treatment. Bar: 70 nm (245). (E) Human cell infected with human respiratory coronavirus HCoV-229E. Spherical virions are seen budding at membranes of the endoplasmic reticulum and in smooth-walled vesicles (*arrows*). The electron-dense helical nucleocapsid is visible as slender, flexible tubules within the virions. The virus particles of some coronaviruses may mature further into electron-dense particles (original magnification, $\times 60,000$). (B: Courtesy of Peter Tijssen, Institut Armand-Frappier, Laval, Quebec, Canada; C and D: Courtesy of Cristina Risco and Luis Enjuanes, CNB-CSIC, Madrid, Spain.)



- Helical nucleocapside
- S – spike protein
- HE – hemagglutinin
esterase glycoprotein,
vazba na sialové kys.
- M – protein, indukce
interferonu, assembly,
budding, contact
membrane with
nucleocapsid
- E – protein, assembly,
apoptosis



doi: 10.1038/nrd.2015.37

Table 1 | Therapeutic interventions used in patients with SARS and MERS

Type of intervention	Therapeutic intervention	Treatment effects	Refs
Treatments used for SARS patients			
Antivirals	Ribavirin	No significant effect on clinical outcome	10,21
	Ribavirin, lopinavir-ritonavir + corticosteroids	Patients who received ribavirin, lopinavir-ritonavir and a corticosteroid had lower 21-day ARDS and death rates than those who received ribavirin and a corticosteroid	76,77
Interferon combination	Interferon alfa-1 + corticosteroid	Associated with improved oxygen saturation and more rapid resolution of radiographic lung opacities than systemic corticosteroid alone (uncontrolled study)	78
Corticosteroids	Pulsed methylprednisolone	Associated with an increased 30-day mortality rate (adjusted OR = 26.0, 95% CI = 4.4–154.8). Disseminated fungal infection and avascular osteonecrosis occurred following prolonged systemic corticosteroid therapy	79–81
		A randomized, placebo-controlled study showed that plasma SARS-CoV RNA levels in weeks 2–3 of the illness were higher in patients given hydrocortisone (n = 10) than those given normal saline (n = 7) in the early phase of the illness, suggesting that early use of pulsed methylprednisolone might prolong viraemia	82
Convalescent-phase plasma	Convalescent-phase plasma therapy	Has been used for severe respiratory tract infections including SARS and influenza. A systematic review and exploratory meta-analysis of patients with SARS or influenza treated with convalescent-phase plasma showed a reduction in mortality, but the treatment success was determined by its availability and timely administration	85,272, 273
		Among 80 non-randomized SARS patients who were given convalescent-phase plasma, the discharge rate at day 22 was 58.3% for patients (n = 48) treated within 14 days of illness onset versus 15.6% for those (n = 32) treated beyond 14 days	83,84
Treatments used for MERS patients			
Combination of antivirals and interferons	Ribavirin + interferon alfa-2a or interferon alfa-2b	No significant effect on clinical outcome; case-control study showed significantly improved survival (14 out of 20 and 7 out of 24 in the treated and control groups, respectively; P = 0.004) at 14 days, but not at 28 days	86–89
	Ribavirin + interferon beta-1a	Retrospective analyses showed no significant effect on clinical outcome	89
	Ribavirin, lopinavir-ritonavir + interferon alfa-2a	Viraemia resolved 2 days after commencement of treatment in a patient with severe MERS	90
Corticosteroids	Pulsed methylprednisolone	Patients with severe MERS who were treated with systemic corticosteroid with or without antivirals and interferons had	87,88, 274

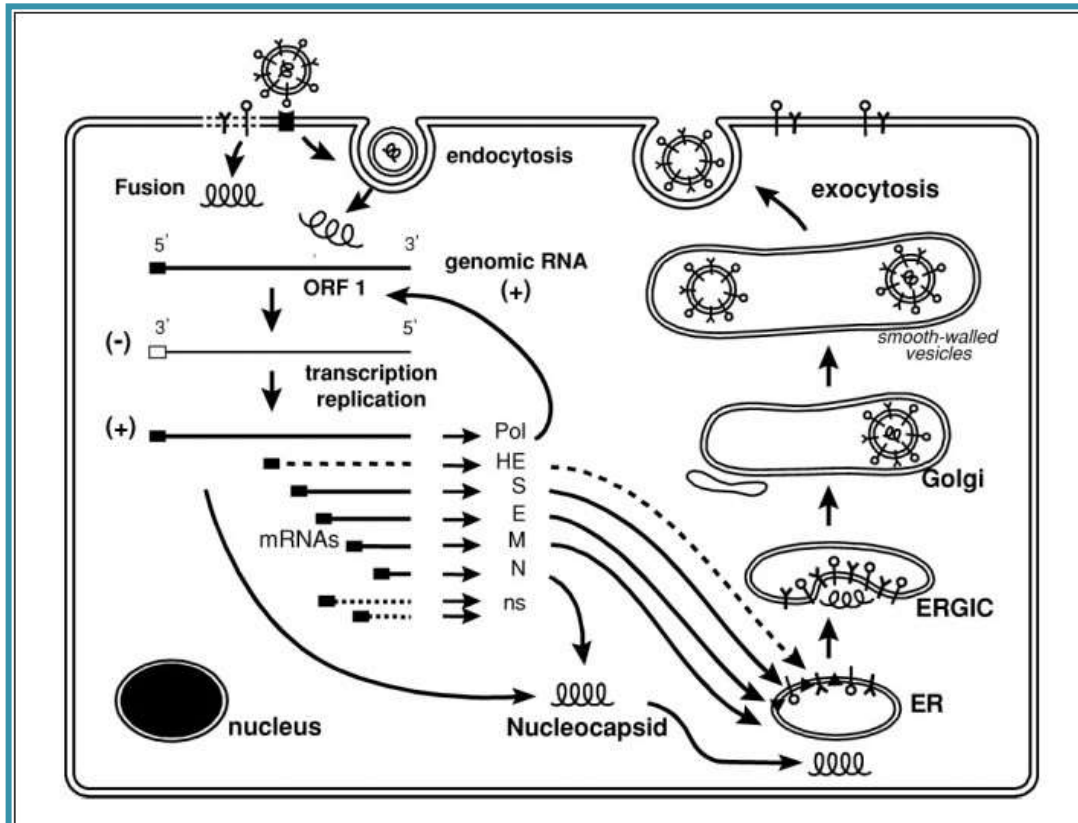


Figure 36.5 Coronavirus replication cycle. Virions bind to the specific receptor glycoproteins or glycans via the spike protein. Penetration and uncoating occurs by S protein-mediated fusion of the viral envelope with the plasma membrane or endosomal membranes. Gene 1 of viral genomic RNA is translated into a polyprotein, which is cotranslationally or posttranslationally processed to yield proteins (collectively called Pol) comprising the transcriptase-replicase complex. The genomic RNA is used as a template to synthesize negative-stranded RNAs, which are, in turn, used to synthesize full-length genomic RNA and subgenomic mRNAs. The mRNAs with dashed lines are variable. With a few exceptions, each mRNA is translated to yield only the protein encoded by the 5'-most open reading frame of the mRNA. These proteins include structural proteins N, M, E, S, and HE and several nonstructural proteins, which vary among different groups of coronavirus. The N protein and newly synthesized genomic RNA assemble to form helical nucleocapsids. The membrane glycoprotein M is inserted in the endoplasmic reticulum (ER) and anchored in the Golgi apparatus. Nucleocapsid (N plus genomic RNA) probably first binds to M protein at the budding compartment (ERGIC) that lies between the ER and the Golgi. E protein is also transported to the ERGIC, where E and M proteins interact to trigger the budding of virions, enclosing the nucleocapsid. The S and HE glycoproteins are glycosylated, trimerized, and transported through the Golgi apparatus; along the transport pathway, S and HE proteins associate with M protein and are incorporated into the maturing virus particles. Excess S and HE proteins that are not incorporated into virions are transported to the plasma membrane, where they may participate in cell-cell fusion or hemadsorption, respectively.

Detekce virové RNA 2019-nCoV

2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-time rRT-PCR Panel Primers and Probes				
Name	Description	Oligonucleotide Sequence (5'>3')	Label ¹	Working Conc.
2019-nCoV_N1-F	2019-nCoV_N1 Forward Primer	5'-GAC CCC AAA ATC AGC GAA AT-3'	None	20 µM
2019-nCoV_N1-R	2019-nCoV_N1 Reverse Primer	5'-TCT GGT TAC TGC CAG TTG AAT CTG-3'	None	20 µM
2019-nCoV_N1-P	2019-nCoV_N1 Probe	5'-FAM-ACC CCG CAT TAC GTT TGG TGG ACC-BHQ1-3'	FAM, BHQ-1	5 µM
2019-nCoV_N2-F	2019-nCoV_N2 Forward Primer	5'-TTA CAA ACA TTG GCC GCA AA-3'	None	20 µM
2019-nCoV_N2-R	2019-nCoV_N2 Reverse Primer	5'-GCG CGA CAT TCC GAA GAA-3'	None	20 µM
2019-nCoV_N2-P	2019-nCoV_N2 Probe	5'-FAM-ACA ATT TGC CCC CAG CGC TTC AG-BHQ1-3'	FAM, BHQ-1	5 µM
2019-nCoV_N3-F	2019-nCoV_N3 Forward Primer	5'-GGG AGC CTT GAA TAC ACC AAA A-3'	None	20 µM
2019-nCoV_N3-R	2019-nCoV_N3 Reverse Primer	5'-TGT AGC ACG ATT GCA GCA TTG-3'	None	20 µM
2019-nCoV_N3-P	2019-nCoV_N3 Probe	5'-FAM-AYC ACA TTG GCA CCC GCA ATC CTG-BHQ1-3'	FAM, BHQ-1	5 µM
RP-F	RNAse P Forward Primer	5'-AGA TTT GGA CCT GCG AGC G-3'	None	20 µM
RP-R	RNAse P Reverse Primer	5'-GAG CGG CTG TCT CCA CAA GT-3'	None	20 µM
RP-P	RNAse P Probe	5'-FAM – TTC TGA CCT GAA GGC TCT GCG CG – BHQ-1-3'	FAM, BHQ-1	5 µM

¹TaqMan® probes are labeled at the 5'-end with the reporter molecule 6-carboxyfluorescein (FAM) and with the quencher, Black Hole Quencher 1 (BHQ-1) (Biosearch Technologies, Inc., Novato, CA) at the 3'-end.

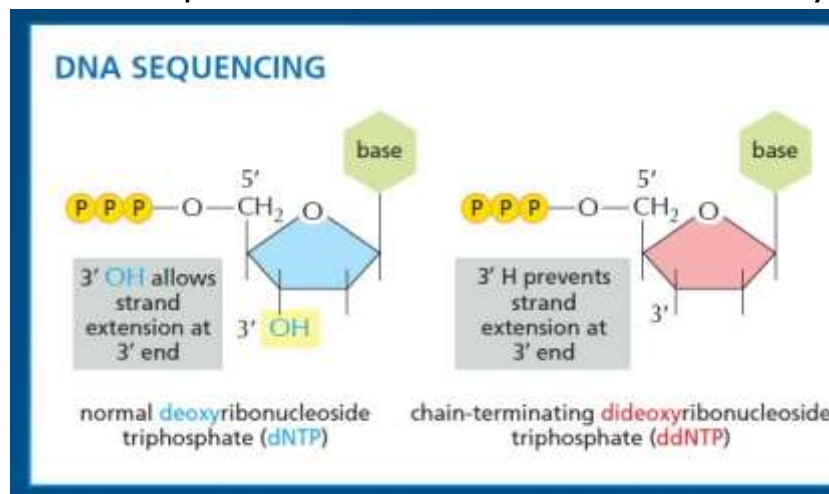
Note: Oligonucleotide sequences are subject to future changes as the 2019-Novel Coronavirus evolves.

- ⊙ TaqMan Assay primery pro detekci koronaviru dle CDC
- ⊙ Detekce různých částí virové RNA

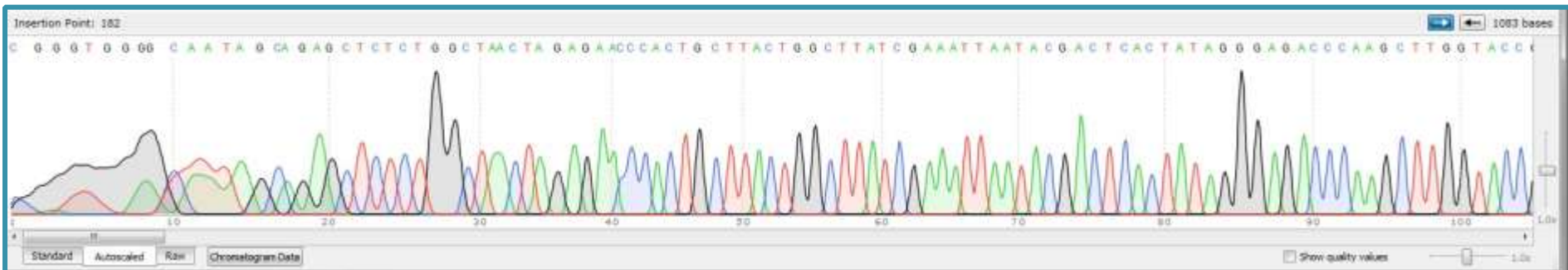
- Threshold – nad 35. cyklus detekce negativní

Sangerovo sekvenování

- PCR reakce s 1 primerem
- Množství produktu narůstá lineárně
- Čteme sekvenci 1 řetězce
- Vhodná **Taq polymeráza**
- Směs deoxyribonukleotidů a dideoxyribonukleotidů**
(ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) 100:1
- ddNTP – postrádá na 3' C 2-deoxyribosy OH skupinu (viz obr.)



- ddNTP jsou značené **fluorescenční značkou**
- Produkty se oddělují **kapilárovou gelovou elektroforézou** (50cm, 0,1cm)
- Během elektroforézy produkty oddělené o 1 nt prochází přes detektor fluorescence
- Limit – 750 bp/1 run
- **Automatizace** – až 7 milionů nt/den
(1 přístroj sekvenuje lidský genom za 2321 dní)



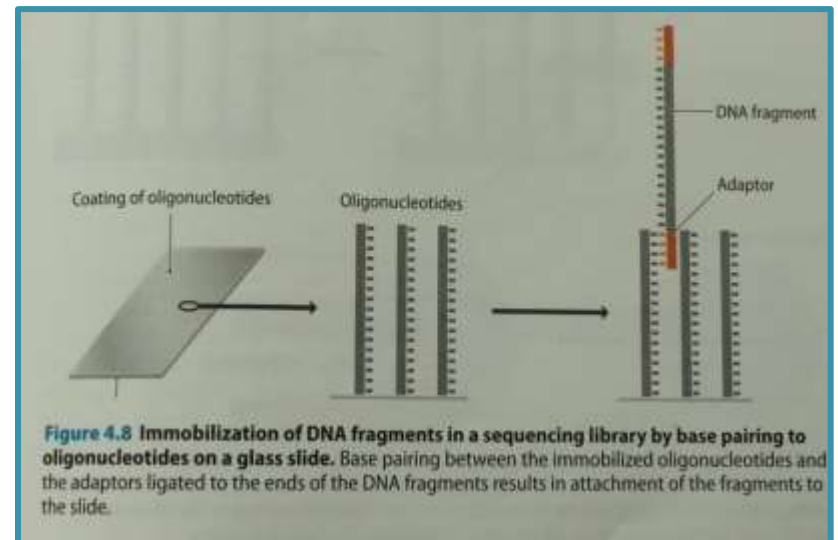
NGS, sekvenování nové generace

- Metody umožňující masivní a paralelní sekvenování (miliony fragmentů se sekvenují v jednu chvíli)

⦿ Postup:

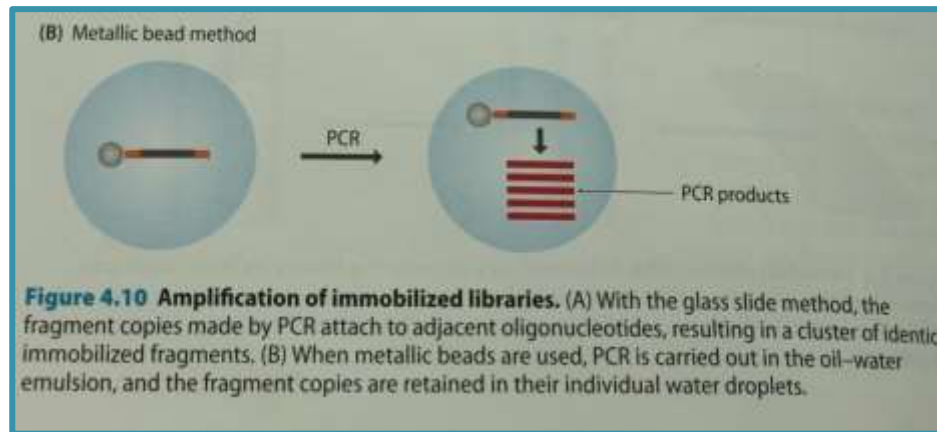
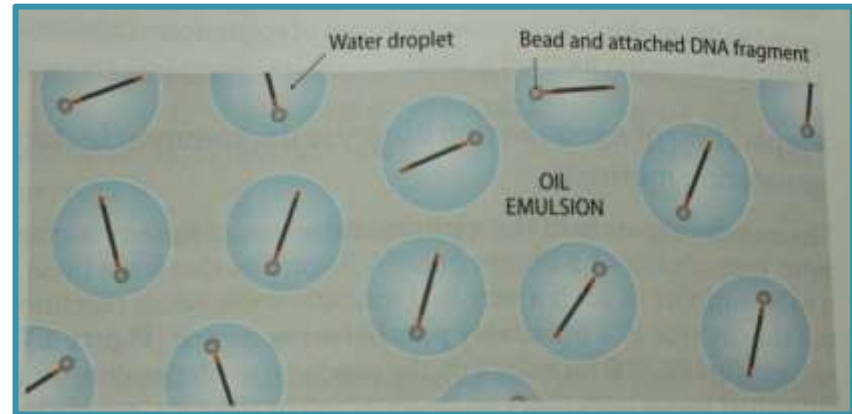
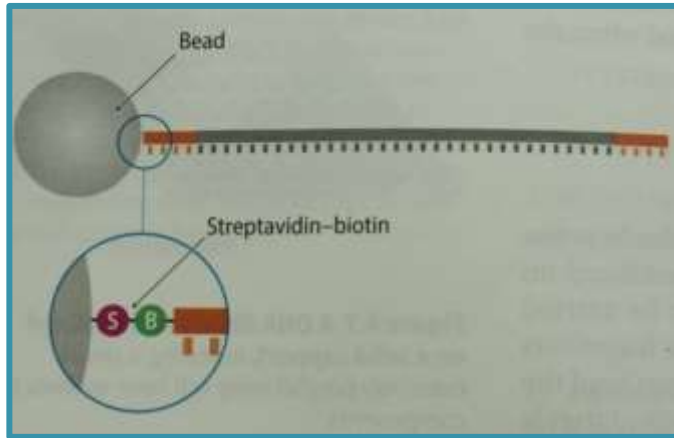
- > Izolace DNA
- > Sonikace (knihovna DNA fragmentů)
- > Imobilizace fragmentů přes sekvenci adaptéru
- > Amplifikace (vznik clusterů)
- > Sekvenování

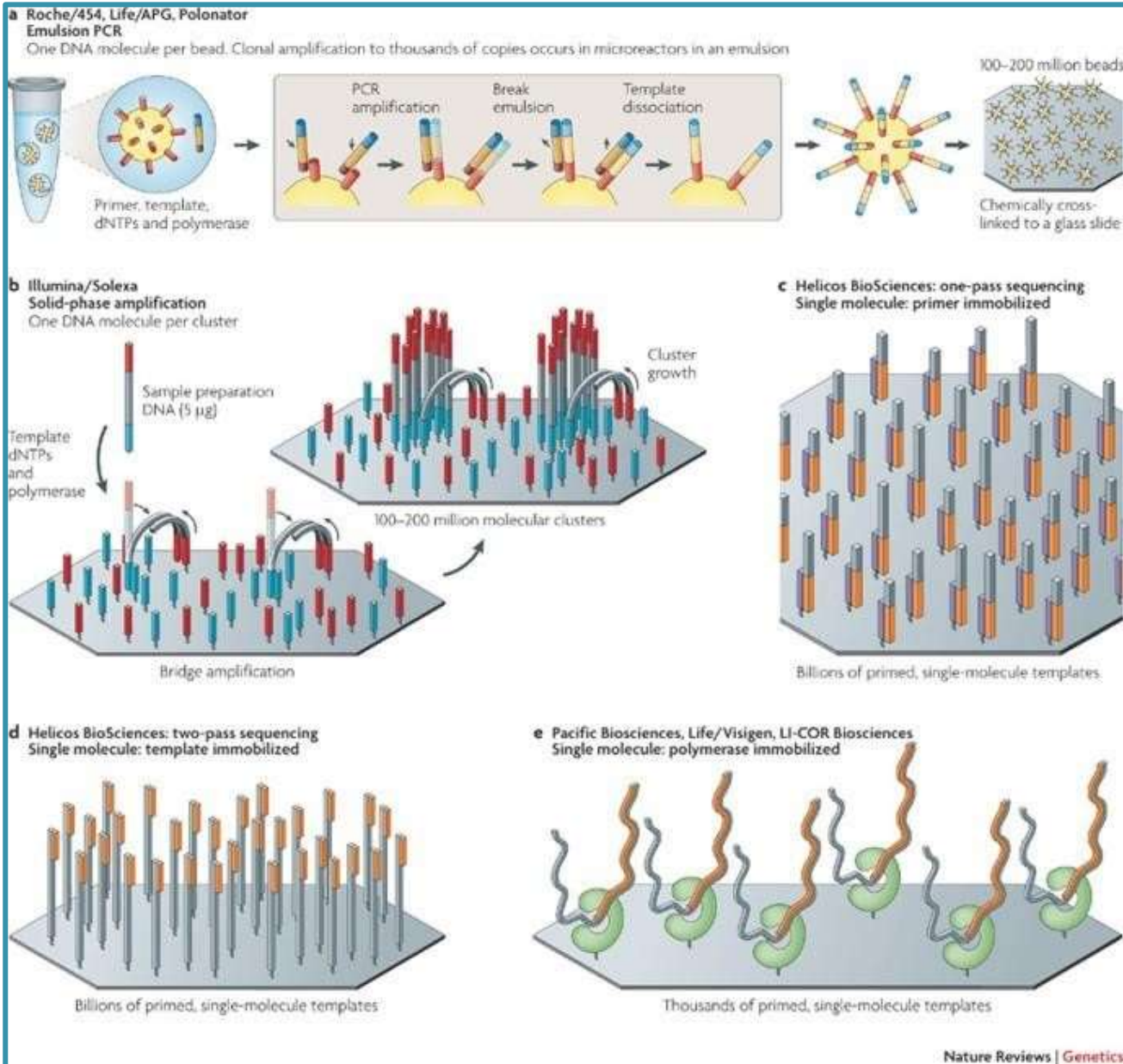
⦿ fragmenty připojené na skleněné



desce ⦿ kovová kulička obalená streptavidinem, váže 1 molekulu DNA, 1 kulička/ 1 kapka

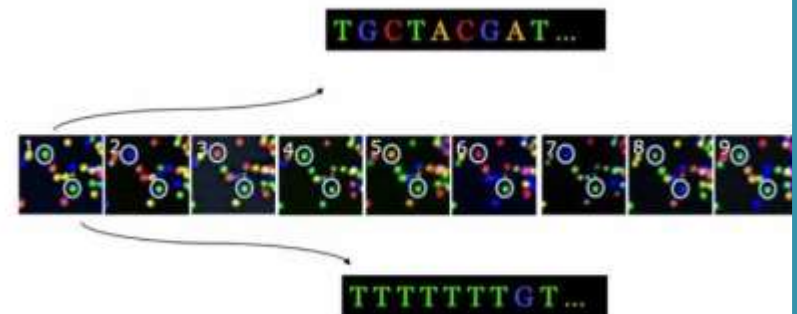
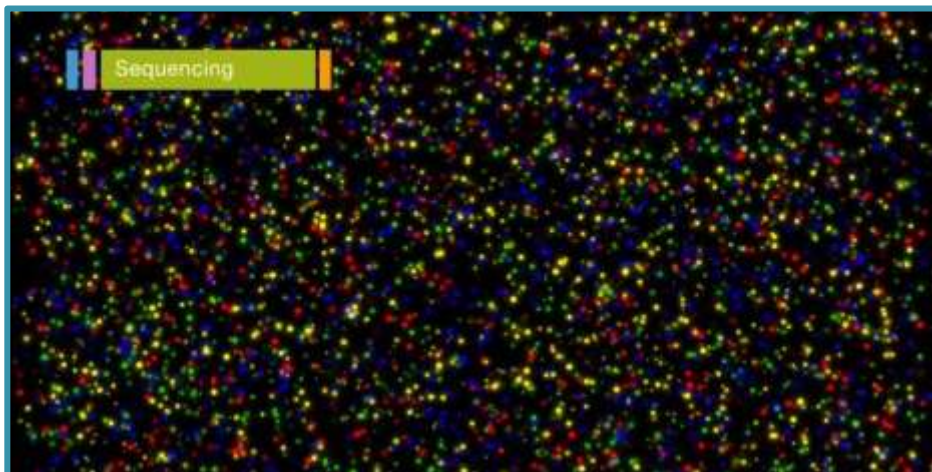
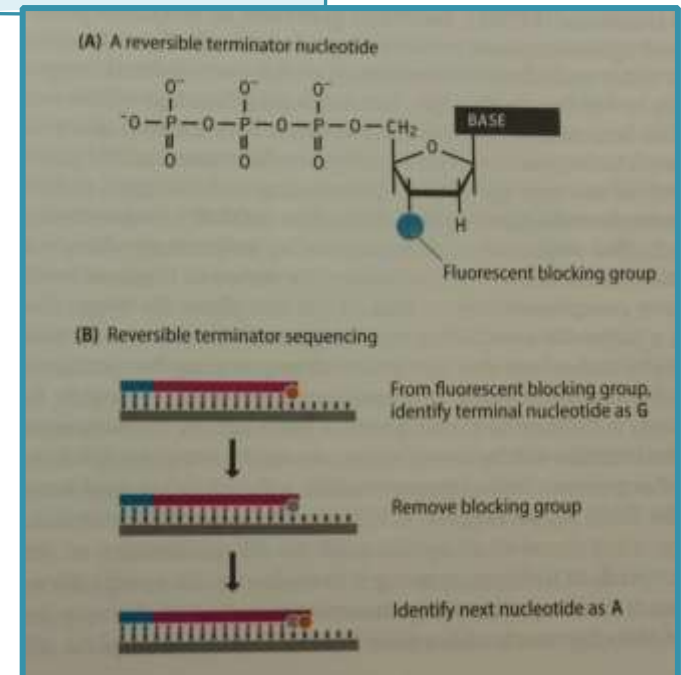
○ připojení na destičku





doi: 10.1038/nrg2626

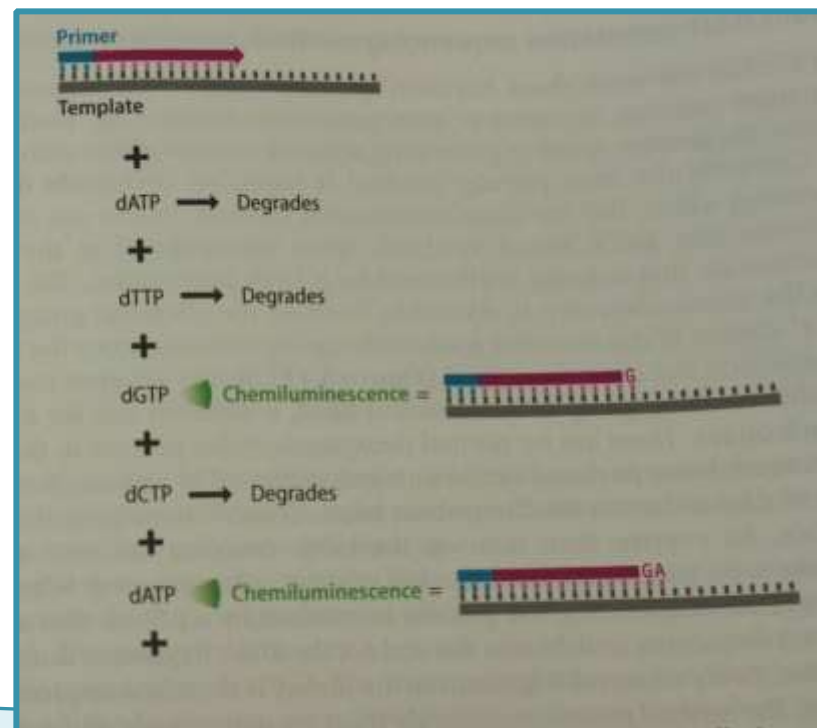
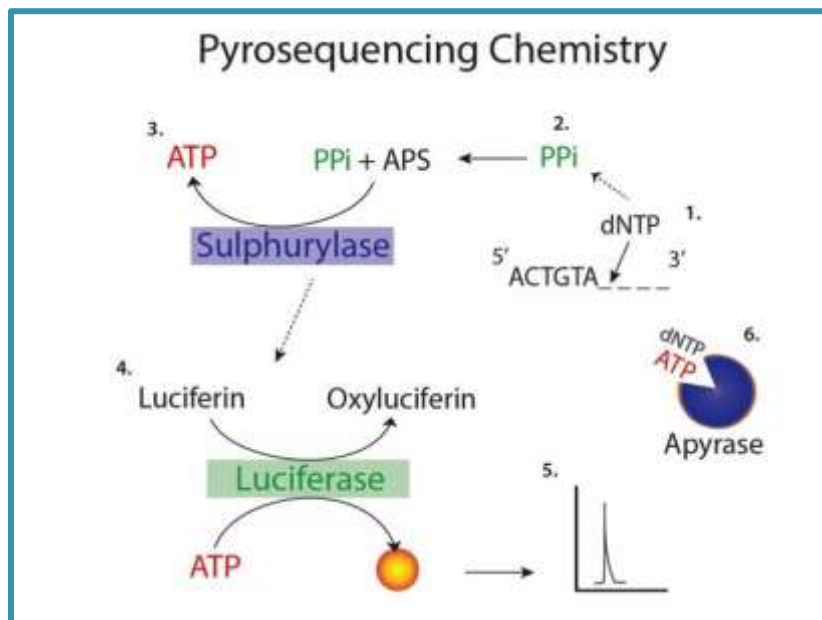
- Princip **reverzibilní terminace**
- Pouze modifikované nukleotidy, které mají místo 3'OH skupiny ribosy připojenou fluorescenční barvu (blokuje připojení dalšího nt)
- Po přečtení signálu je enzymaticky odstraněna fluorescenční barva
- Zisk: **300 bp/2000 Mb** sekvence (1 run)



Pyrosekvenování (454 sekvenování)

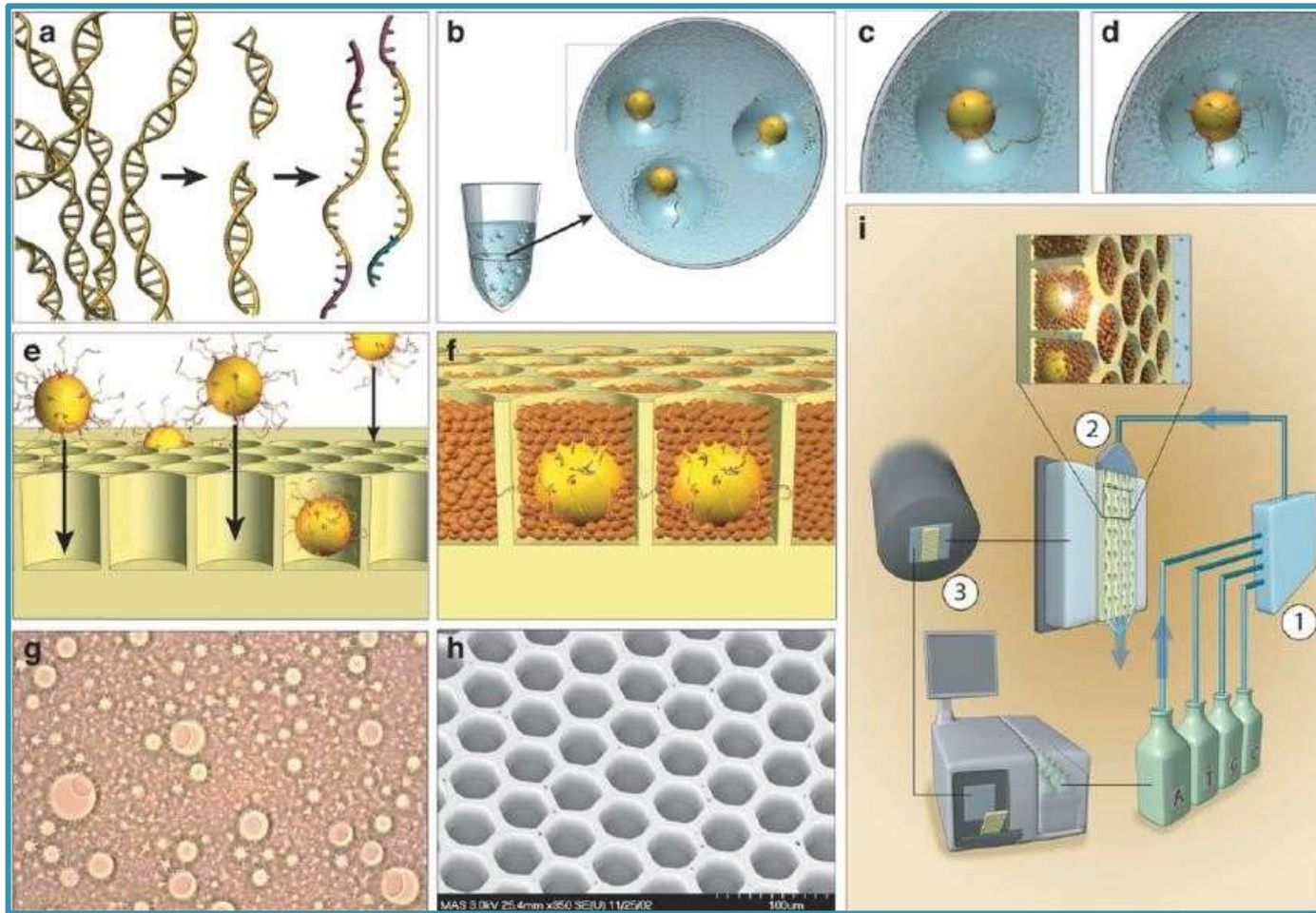
- ⦿ Princip: **zařazení nt uvolní pyrofosfát, který můžeme po sérii chem. reakcí detekovat jako chemiluminiscenční signál**
- ⦿ Žádné modifikované nukleotidy
- ⦿ Pyrofosfát se přemění na ATP
- ⦿ Enzym luciferáza využívá ATP k přeměně luciferinu na oxyluciferin a produkuje světelný puls (chemiluminiscence)

- ⦿ Zisk: **1000 bp/700 Mb** (1 run)



Pyrosekvenování (454 sekvenování)

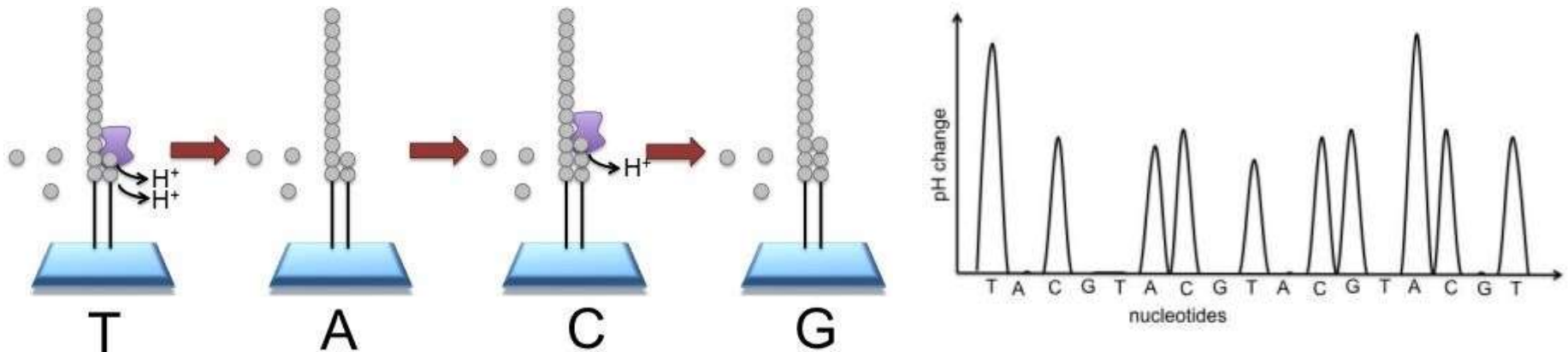
- ⦿ Fragmenty DNA jsou navázány na magnetické kuličky, které jsou umístěny do jamiček naplněných olejem



DOI: 10.1039/b616252e

Ion torrent sekvenování

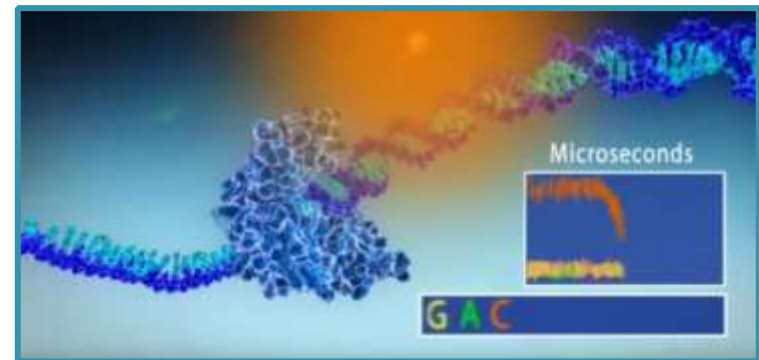
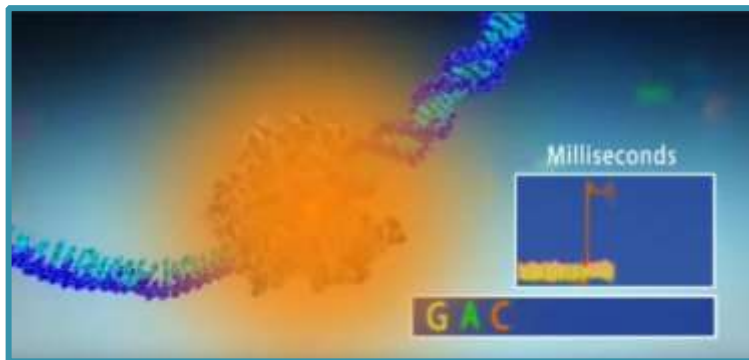
- Princip: zařazení nt uvolní proton (vodíkový iont), dochází ke změně pH, který můžeme detekovat jako elektrický puls pomocí detektoru (ISFET)
- Zisk: 400bp
- Nízká cena



VIDEO: <https://www.youtube.com/watch?v=WYBzbxIfuKs>

SMRT - 3. generace sekvenování

- Vyvíjeny za účelem zrychlení kroku detekce signálu
- Metoda **SMRT** (single-molecule real time sequencing)
 - > Podobná Illumině (použití fluorescentně značených nt)
 - > Čtení fluorescentního signálu probíhá v reálném čase pomocí zařízení „zero-mode waveguide“
 - > Pacific Biosciences (PacBio sequencing)



<https://www.youtube.com/watch?v=v8p4ph2MAvI>

Nanopore sekvenování – 4. generace

- Membrána s nanopórem, která velikostí odpovídá velikosti řetězce DNA
- Helikáza připojená k nanopóru a rozvolňuje DNA, do póru vstupuje jen 1 řetězec
- Řetězec postupuje pórem do prostředí s pozitivním nábojem společně s ionty**
- Každý nt má jiný tvar - **množství iontů, které se dostávají skrze pór je různé v závislosti na daném nt**
- Měříme transport iontů v reálném čase
- Úseky o velikosti až **50 000 bp** (nevyužívá polymerázy)

