

**Mendelova univerzita v Brně**

**Agronomická fakulta**

**Ústav biologie rostlin**

**Inovace praktických cvičení molekulárně-biologických předmětů o  
sekvenční úlohy**

**PRACOVNÍ PROTOKOL PRO PŘEDMĚT GENETICKÁ DIVERZITA**

**Vypracováno v rámci projektu FRVŠ MŠMT 447/ 2012/ F4a.**

**Ing. Eva Konečná**

**Ing. Pavel Hanáček, Ph.D.**

**2012**

**Název úlohy:** Sekvenční analýza vybraných kódujících a nekódujících oblastí chloroplastové a jaderné DNA u hrachu

**Použité přístroje:**

horizontální elektroforéza se zdrojem  
Proffesional Basic Gradient Termocycler (Biometra)  
gelový dokumentační systém (GDS)  
spektrofotometr Picodrop (East Port)

**Pracovní pomůcky:**

jednokanálové pipety Nichiryo  
spotřební plast – špičky, mikrozkuhavky pro PCR

**Použité chemikálie:**

Promega GO Taq-polymeráza s pufr, směs dNTPs Serva, oligonukleotidy pro specifickou PCR amplifikaci chloroplastové (*matK*, *trnH-psbA*) a jaderné DNA (*ITS*), genomová DNA *Pisum sativum* izolovaná kitem DNEasy Plant Mini Kit (Qiagen), potřeby pro agarózovou elektroforézu (agaróza, TAE pufr, roztok ethidium bromidu), velikostní marker Quick-Load® 100 bp DNA Ladder (NEB), 3M octan sodný CH<sub>3</sub>COONa, 96% EtOH.

**Použité programy:**

ClustalW- <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>  
BioEdit- <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>  
MEGA- <http://www.megasoftware.net/>

**Studované oblasti DNA:**

Pro účely fylogenetiky se používají rozmanité sekvence DNA o různé délce z různých částí rostlinného genomu. Tyto DNA markery je možné dělit podle lokalizace v buňce na jaderné, plastidové a mitochondriální. Může se jednat buď o sekvence kódující (geny pro proteiny a funkční RNA), nebo nekódující (introny, mezerníky, pseudogeny aj.). *Mat K* je sice jedna z nejrychleji se rozvíjejících kódujících oblastí chloroplastové DNA, ale nekódující oblasti cpDNA, jako *trnH-psbA*, jsou mnohem variabilnější. Podléhají více mutacím a v rámci fylogenetických studií je můžeme úspěšně použít i na nižší taxonomické úrovni (mezirodová,

vnitrodruhová). ITS je nekódující oblast nacházející se mezi velmi konzervovanými kódujícími oblastmi 18S a 28S rRNA. Vyvíjí se rychleji než většina jiných genů, z čehož plyne, že se může velmi lišit i mezi úzce příbuznými druhy a může být proto dobrým markerem.

## Pracovní postup:

### PCR s templátovou DNA hrachu a primery pro oblasti *matK*, *trnH-psbA* cpDNA a ITS oblast nDNA

1. Namíchat reakční směs po všechny 3 páry primerů lokusů A) *matK*, B) *trnH-psbA*, C) ITS, podle tabulky. Všechny komponenty, které byly zamrazeny, vyjma polymerázy, je potřeba po rozmrazení promíchat pomocí vortexu:

1 x 50 µl	1 reakce (µl)
Ultračistá voda	33
Pufr pro Green Taq (Promega)	10
dNTPs (10 mM od každé báze)	0,6
Primer F (10 pmol/µl)	2
Primer R (10 pmol/µl)	2
Taq DNA-polymeráza (5U/µl) (Promega)	0,4
Templátová DNA	(2)
	48

2. Promíchat reakční směs pomocí vortexu.
3. Rozdělit reakční směs po 48 µl do zkumavek pro PCR (0,2 ml).
4. Přidat do zkumavek po 2,0 µl DNA.
5. Zkumavky vložit do termocykleru a spustit program:

Cyklus č.	Počet opakování	Teplota (°C)	Čas (m:s)
1	1	94	3:00
2	30	94	0:30
		55	0:30
		72	0:45
3	1	72	10:00
		4	∞

6. Po skončení programu aplikovat 2 µl vzorku na 1% agarózový gel a otestovat úspěšnost PCR pomocí horizontální elektroforézy.
7. Gel nasnímat pomocí GDS.

### **Purifikace PCR produktu ethanolem a octanem sodným**

Purifikací (přečištěním) PCR produktu dojde k odstranění zbylých primerů a neinkorporovaných nukleotidů pomocí např. komerčních kitů nebo levnějších variant jako je metoda purifikace PCR produktu etanolem a octanem sodným. Při tomto postupu dojde i k odstranění přebytku primerů - postup je tudíž vhodný i pro purifikaci vzorků před automatickým sekvenováním.

1. Pipetovat 50 µl PCR reakční směsi do 0,6 mikrozkušavky (při menším objemu přidat ultračistou vodu, při větším objemu přidat adekvátně větší množství dalších komponent).
2. Přidat 7,5 µl 3M octanu sodného, 156,25 µl 96% EtOH a 36,25 µl ultračisté vody, zavřít mikrozkušavku, vortexovat (při více vzorcích je možné směs namíchat dopředu, vortexovat a alikoty rozpipetovat).
3. Nechat stát 15 minut při laboratorní teplotě.
4. Vložit do centrifugy (označit orientaci mikrozkušavky v centrifuze), centrifugovat cca při 13 000rpm/20 minut.
5. Ihned po centrifugaci odebrat špičkou všechnu supernatant.
6. Přidat 250 µl 70% EtOH, zavřít mikrozkušavku a vortexovat.
7. Vložit do centrifugy (správnou orientací) a centrifugovat při cca 13 000 rpm/5 min.
8. Opět rychle odstranit supernatant, vzorky vysušit a pelet rozpustit v ultračisté vodě či vhodném pufru (0.1 TE apod.).

Vzorek DNA uchovat v lednici či mrazáku.

### **Sekvenční analýza**

Vyhodnotit získané sekvence pomocí vhodných softwarů např. ClustalX a BioEdit. Ke konstrukci fylogenetických stromů je možné použít programy MEGA a TreeView.

#### **Vyhodnocení sekvenování:**

#### **Posouzení kvality sekvencí**

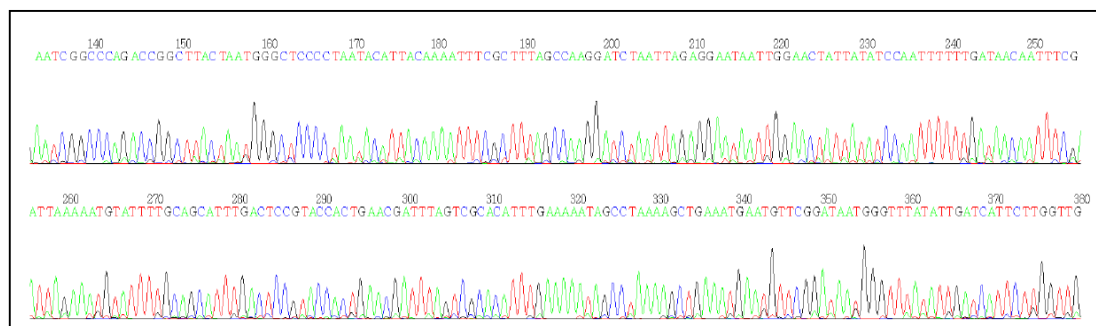
- Otevřít \*.zip soubor se sekvencemi a postupně zkontrolovat, zda jsou všechny elektroforetogramy čitelné a vyhodnotitelné **Obr. 1.**

- Sekvence v antisense orientaci převést do sense orientace. Sekvenci v \*.AB1 formátu otevřít pomocí programu BioEdit a v nabídce „view“ zatrhnout „ Reverse Complement“. Následně sekvenci uložit v nabídce „File“ vybrat „Export as Fasta“.
- U vyhodnotitelných souborů (píky jsou zřetelně čitelné bez výrazných překryvů) sloučit sekvence ve formátu FASTA do jediného souboru (k jednomu z \*.txt souborů přikopírovat postupně všechny ostatní tak, aby každá z položek začínala na samostatném řádku znakem “>”).

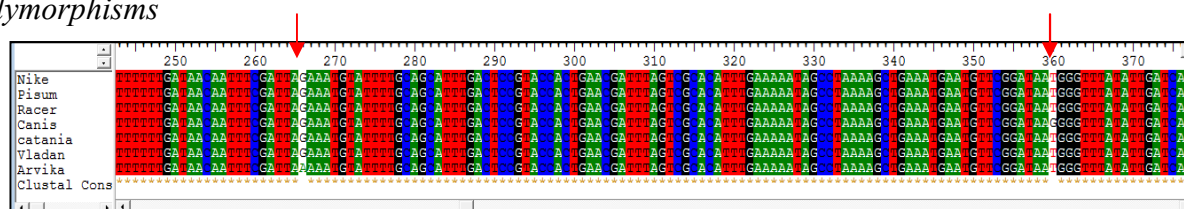
### Multiple alignment a editace sekvencí

- Spustit program ClustalX, v nabídce „File“ zvolit „Load Sequences“ a vybrat vytvořený FASTA soubor v \*.txt (je vhodné, aby v názvu souboru a v řádcích za znakem “>“ byly jen běžné znaky, ne tečky, hvězdičky, mezerníky, lomítka a pod.)
- V nabídce „Alignment“ vybrat „Do Complete Alignment“ **Obr. 2**, zvolit místo uložení na disku a odkliknout „Align“, získaný alignment je ve formátu \*.dnd.
- Otevřít program MEGA a v nabídce „Alignment“ vybrat „Alignment Explorer/CLUSTAL“, v tabulce zvolit „Retrieve sequences from a file“ a potvrdit.
- Označit sekvence a v nabídce vybrat „Align by ClustalW“ a potvrdit „OK“
- Pomocí panelu „Edit“ je možné sekvence editovat.
- Postupně procházet sekvence a porovnávat je s elektroforetogramy (\*.ab1), které otevíráme v programu BioEdit a opravujeme případné chyby a nesrovnalosti pomocí „Copy“, „Paste“ a „Cut“.
- Opravené sekvence zarovnat odstraněním nečitelných sekvencí na začátku a konci (vybrat do bloku a odstranit pomocí klávesy „Delete“).
- Uložit editovanou sekvenci \*.meg formátu a v tomto formátu opět otevřít v programu MEGA.
- Z takto upravených sekvencí lze následně vytvořit dendogram podobnosti pomocí nabídky „Phylogeny“ a „Construct Phylogeny“ **Obr. 3**, kde vybereme metodu konstrukce dendogramu a volíme další parametry.

**Obr. 1** Ukázka čitelnosti elektroforeogramu sekvence *matK* oblasti



**Obr. 2** Multiple alignment sekvencí *matK* oblasti s vyznačenými SNPs- Single Nucleotide Polymorphisms



**Obr. 3** Ukázka výsledného dendogramu *matK* oblasti vybraných genotypů hrachu sestrojeného pomocí softwaru MEGA 4.1 metodou Maximum Parsimony.

