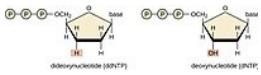
Sekvenování DNA

Sekvenace (vzácně též *sekvencování*) je souhrnný termín pro metody, které umožňují popsat pořadí nukleotidů v určitém úseku DNA. Těmito metodami lze nepřímo analyzovat i sekvenci RNA, je-li reverzní transkripcí převedena na DNA. V praxi jsou dnes používány především dvě metody založené na replikaci DNA – starší **Sangerova sekvenace** a novější, principem složitější **sekvenování nové generace – *Next Generation Sequencing***.

Historické metody sekvenace (pro více informací rozbalte) [Expand]

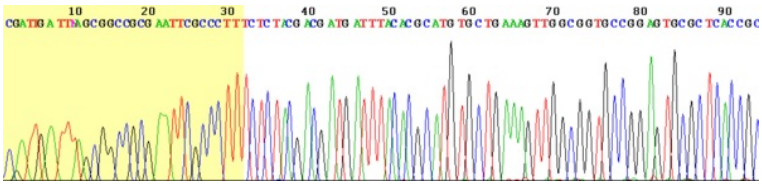
Sangerovo sekvenování

V roce 1977 Frederick Sanger vytvořil metodu sekvenování, za níž dostal v roce 1980 Nobelovu cenu. Základem je modifikovaná **replikace DNA** – v replikační směsi jsou smíchány standardní ***deoxyribonukleotidtrifosfáty*** (dNTPs) se speciálními ***dideoxyribonukleotidfosfáty*** (ddNPTs). Ty si jsou navzájem chemicky podobné, avšak chybějící OH skupina ddNTP neumožňuje další pokračování replikace.


Rozdíl dNTP a ddNTP

Při moderním provedení probíhá reakce následovně – v reakční směsi je přítomna **templátová** (zkoumaná) **DNA**, **DNA-polymeráza**, **sekvenační primery** a **dNTPs** (tedy dATP, dGTP, dCTP, dTTP), tedy všechny substráty replikace. Dále směs obsahuje **fluorescenčně označené ddNTPs**. Spolu s pufrovacími roztoky, potřebnými ionty a dalšími stabilizátory se tato směs reagencií pro amplifikaci DNA metodou PCR označuje jako ***mastermix***. DNA-polymeráza zde v úseku ohraničeném sekvenačními primery replikuje zkoumanou templátovou molekulu DNA, k čemuž používá směs dNTPs a ddNTPs. Tyto nukleotidy jsou začleňovány do řetězce na bázi komplementarity k templátové DNA stejně jako při běžné replikaci. Náhodně se začleňující ddNTPs však ukončují reakci za vzniku různě dlouhých fragmentů. Analýzou pomocí kapilární elektroforézy poté seřadíme jednotlivé fragmenty podle délky, takže koncové nukleotidy postupně se prodlužujících fragmentů vytvoří celistvou řadu, proběhlo-li dostatečné množství reakcí.

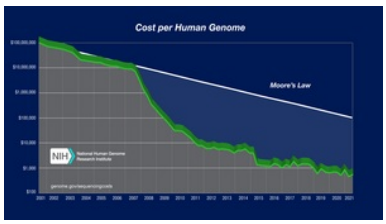
Fluorescenční peaky značící jednotlivé baze koncových ddNTPs umožní odečíst výslednou sekvenci. Taková data může analyzovat počítačový program. Prvních několik bazí je obvykle nehodnotitelných – v případě krátkých fragmentů dochází k nespecifickým vazbám a vzniká málo kýženého replikačního produktu. Je proto potřeba navrhovat primery dostatečně před místem, které je cílovou oblastí (targetem) pro sekvenování. Výsledek znázorňuje následující obrázek.


Výsledek sekvenace úseku DNA automatickým sekvenátorem. Žlutě zbarvená část značí počáteční úsek sekvenace, který neposkytuje kvalitní data.

Původní metoda 4 oddělených zkumavek (pro více informací rozbalte) [Expand]

Next Generation Sequencing

Sekvenování nové generace (z angl. *next generation sequencing* – **NGS**) je označení moderních metod sekvenování, které využívají **bioinformatické metody** ke zpracování velkého množství sekvenačních dat a jejich porovnání s **referenčním genomem**. Při NGS jsou zpracovávány tisíce až miliony sekvencí současně, což má za následek obrovské množství výstupních dat (proto někdy také nazýváno *masivně paralelní sekvenování*). Principy sekvenování jsou u jednotlivých výrobců odlišné, stejně tak se liší metody přípravy vzorku. Jedno spuštění sekvenátoru je oproti Sangerově metodě nákladnější a vyžaduje komplexnější vybavení a reagencie, avšak umožní sekvenování velkého množství zdrojové DNA za krátký čas a při dostatečném obratu i velmi nízkou cenu oproti Sangerově metodě. Při NGS lze sekvenovat dlouhé úseky DNA (až celý genom), více úseků DNA z jednoho vzorku, jeden úsek v mnoha opakováních pro zvýšení přesnosti měření či mnoho podobných úseků DNA z různých vzorků. Za posledních 20 let se cena sekvenování lidského genomu díky NGS snížila z řádu milionů dolarů na stovky.



Vývoj ceny sekvenování lidského genomu

Mezi jednotlivými metodami NGS jsou velmi zásadní odlišnosti. Dnes nejčastěji používanou metodou je *sequencing by synthesis*, mezi další principy patří pyrosekvenování, iontové polovodičové sekvenování či sekvenování ligací. Rozdíly jsou také v přípravě vzorků v závislosti na požadovaném postupu.

Příprava sekvenační knihovny

Sekvenování nové generace předchází relativně dlouhá preanalytická fáze, při které vzniká roztok připravený pro sekvenování na daném přístroji, tzv. **sekvenační knihovna**:

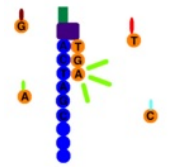
1. Nejprve je třeba (stejně jako u jiných metod sekvenace) **izolovat DNA** ze vzorku. Různými metodami docílíme odstranění buněčných membrán, proteinů, sacharidů, lipidů či dalších látek, jako jsou sloučeniny používané pro fixaci vzorku při jeho uchovávání.
   - Po obdobném procesu izolace RNA je možné pomocí enzymu reverzní transkriptázy převést RNA na DNA a sekvenovat tak baze transkriptomu.
2. V případě některých postupů jsou pomocí PCR amplifikovány části DNA, které chceme sekvenovat. Nejprve je však ověřena koncentrace vstupní DNA a celistvost fragmentů (tedy jsou-li izolované molekuly DNA dostatečně dlouhé a je jich ve vzorku potřebné množství pro analýzu). Některé z méně často používaných metod NGS přípravnou amplifikaci nepotřebují.
3. V závislosti na vybrané metodě sekvenování je třeba adekvátně připravit vzorky a reakční směs sekvenátoru. Základními dvěma metodami přípravy knihovny je amplikonové a enrichmentové sekvenování:
   - Při **amplikonovém sekvenování** využíváme konkrétně definované primery pro dané úseky DNA, které sekvenujeme. Úseky jsou krátké a jsou sekvenovány v mnoha opakováních. Můžeme se tak detailně s vysokou přesností zaměřit na konkrétní změny v sekvenci daného genu – tato metoda se nejčastěji využívá pro sekvenování mnoha kratších vzorků například při screeningu nádorových mutací u více pacientů.
   - **Enrichmentové sekvenování** pracuje s mnohem delšími fragmenty, umožňuje tak efektivněji zkoumat delší úseky DNA, například při celogenomovém sekvenování, resekvenování či hledání nových či neznámých mutací v širší oblasti. Při této metodě jsou používány značené sondy, do amplifikace vstupují pouze specifické úseky vymezené těmito sondami po purifikaci na magnetických

partikulích. Tímto krokem dochází ke snížení tvorby nežádoucích produktů amplifikace, vznikajících při amplikonovém sekvenování nespecifickým množením krátkých sekvencí při překrývání amplikonů.

4. V závislosti na použité metodě je také různými způsoby označena příslušnost sekvence k danému vzorku – vzhledem k tomu, že je paralelně sekvenováno více vzorků, využívá se například značení ***indexy***, což jsou krátké oligonukleotidy přidané na začátek či konec sledované sekvence. Některé z metod sekvenace vyžadují také připojení tzv. adaptorových sekvencí, které umožňují fixaci připravených fragmentů DNA k danému místu určenému pro jeho sekvenování.

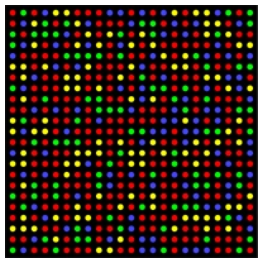
Sekvenování syntézou a bioanalytika

Sekvenování syntézou je nejčastěji používanou metodou vlastní sekvenace, v roce 2013 pokrývalo cca 90 % trhu [1]. Zde je tedy uvedeno jako nejčastější příklad zpracování vzorku po dříve popsané přípravě sekvenační knihovny.



Sekvenování syntézou

Pomocí adaptorových sekvencí se přichytí analyzované fragmenty na *flow-cell* sekvenátoru (skleněná deska s miliony fixovaných oligonukleotidů komplementárních k adaptorovým sekvencím). Sledem dalších reakcí dochází k replikaci DNA a přichycení replikátů jako dalších templátů na *flow-cell*. Při sekvenování DNA polymerázy katalyzují probíhající replikaci s fluorescenčně značenými dNTPs, takže přístroj zaznamenává různé barevné signály pro jednotlivé baze v přesně definované síti vazebných míst *flow-cell*. Schematicky tento čtyřbarevný obraz *flow-cell* v jednom momentu ukazuje obrázek vpravo. Přístroj získá v několika čteních od jednoho vzorového fragmentu DNA stovky čtení v obou směrech.


Flow-cell sekvenátoru

Vzniklé „video“ zachycující miliony simultánně snímaných měnících se barevných bodů analyzuje počítačový program, který sestaví jednotlivé sekvence, přiřadí je pacientům/vzorkům podle indexových sekvencí, vyhodnotí podobnost měření stejných úseků a množství odchylek mezi měřeními a oproti referenčnímu genomu. Při tzv. *alignmentu* software vyhodnotí podle předepsaných dat, které úseky snímané při sekvenaci bude porovnávat s referenční sekvencí, a odstraní přebytečná data (nadbytečně sekvenované části DNA, nespecifické replikáty, sekvence primerů atd.)

Video popisující *sequencing by synthesis*

Další metody NGS

Různí výrobci využívají alternativních metod sekvenování nové generace. Pyrosekvenování využívá reversibilní terminace transkripce za pomoci několika propojených enzymatických reakcí. Tato metoda byla první NGS metodou uvedenou na trh, pro překonání jinými výrobci však byla výroba nových přístrojů původním výrobcem postupně ukončena po roce 2013 [2].

Sekvenování za pomoci ligace oligonukleotidů využívá značené reakce, při které enzym ligáza k primeru připojuje oligonukleotidy se známou sekvencí na bázi komplementarity k templátové DNA. Tato metoda má nejnižší míru chybovosti.

Další metody, jako je sekvenování na polovodičovém čipu či nanopórech, jsou málo používané.

Využití sekvenování v medicíně

Jak Sangerovo sekvenování, tak NGS mají široké uplatnění ve více odvětvích medicíny. Jedná se o medicínu preventivní/prediktivní – využíváme biomarkery rizika vývoje onemocnění, například mutací BRCA; diagnostické analýzy umožňující potvrzení daného onemocnění či jeho rozsah (Huntingtonova chorea) a také vyšetření prediktivních či prognostických biomarkerů, které popisují závažnost daného onemocnění a jeho možnou léčbu. Příkladem těchto vyšetření je například hodnocení mutací HER-2/neu receptoru u nádorů prsu či mutací tyrozinkinázových signalizačních kaskád u kolorektálního karcinomu. Dále je sekvenování využíváno ve forenzní medicíně či mikrobiologii.

Sangerovo sekvenování je primárně používáno při nutnosti sekvenace malého množství krátkých vzorků. Při sekvenování většího množství dat jsou však jeho výhody ve většině případů překonány možnostmi NGS.

Odkazy

Související články

- Struktura nukleových kyselin
- Základní složky nukleových kyselin
- Primární struktura nukleových kyselin
- Štěpení nukleové kyseliny hydrolýzou
- Sekundární struktura DNA
- Denaturace nukleových kyselin, molekulární hybridizace
- Sekundární struktura RNA
- Topologie DNA
- Interakce DNA s proteiny
- Bakteriální chromozom
- Eukaryotické chromosomy
- DNA mitochondrií

Reference

1. REIFOVÁ, Radka. *Sekvenování Nové Generace : Přednáška předmětu Genetické metody v zoologii* [online]. Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy, ©2013. [cit. 2021-06-14]. <http://web.natur.cuni.cz/zoologie/biodiversity/prednasky/GenetickeMetodyVZoologii/Prednasky_2013/NextGenerationSequencing_2013.pdf>.
2. GenomeWeb. *Roche Shutting Down 454 Sequencing Business* [online]. Poslední revize 16-03-2013, [cit. 2021-06-14]. <https://www.genomeweb.com/sequencing/roche-shutting-down-454-sequencing-business>.

Externí odkazy

- Illumina. *NGS for beginners* [online]. [cit. 2021-05-26]. <https://www.illumina.com/science/technology/next-generation-sequencing/beginners.html>.
- NOVOTNÁ, Marcela. *Princip NGS metody* [online]. ©2018. [cit. 2021-07-04]. <https://www.vuab.cz/princip-ngs-metody/>.

Použitá literatura

- BEHJATI, Sam a Patrick S TARPEY. What is next generation sequencing?. *Arch Dis Child Educ Pract Ed* [online]. 2013, vol. 98, no. 6, s. 236-8, dostupné také z <https://doi.org/10.1136/archdischild-2013-304340>. ISSN 1743-0585 (print), 1743-0593.
- Přírodovědecká fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích. *Sekvenování, genomika (přednáška z předmětu Základy moderní biologie)* [online]. [cit. 2021-05-24]. <https://www.prf.jcu.cz/zmb/menu/sekvenovani-genomika.html>.
- ŠTÍPEK, Stanislav. *Stručná biochemie : Uchování a exprese genetické informace.* 1. vydání. Medprint, 1998. 92 s. s. 13–14. ISBN 80-902036-2-0.

*Další kapitoly z knihy **ŠTÍPEK, S.: Stručná biochemie uchování a exprese genetické informace**:*

Struktura nukleových kyselin: Základní složky nukleových kyselin • Primární struktura nukleových kyselin • Řetězec nukleové kyseliny lze štěpit neenzymovou nebo enzymovou hydrolýzou • Metody sekvencování • **Sekundární a vyšší struktura nukleových kyselin:** Sekundární struktura DNA • Denaturace a reasociace řetězců nukleových kyselin, molekulární hybridizace • Sekundární struktura RNA • Topologie DNA; • Interakce DNA s proteiny, struktura chromosomu • Bakteriální chromosom • Eukaryotické chromosomy • DNA mitochondrií

Biosyntéza nukleových kyselin: Replikace DNA • Transkripce

Biosyntéza polypeptidového řetězce – translace: Transferové RNA (tRNA) • Aktivace aminokyselin, syntéza aminoacyl-tRNA • Funkce ribozómů v translaci • Translace u prokaryotů • Struktura ribozómů • Iniciace translace • Elongace peptidů • Terminace translace • Inhibitory bakteriální translace • Translace u eukaryotů • Struktura ribozómů • Iniciace eukaryotické translace • Elongace eukaryotické translace • Terminace eukaryotické translace • Inhibitory eukaryotické translace

Genetický kód

Biosyntéza nukleových kyselin a proteosyntéza v mitochondriích: Replikace mitochondriální DNA • Mitochondriální transkripce • Mitochondriální translace

Řízení genové exprese a proteosyntézy: Řízení genové exprese a proteosyntézy u prokaryot • Regulace na úrovni transkripce • Regulace sigma-faktory • Jacobův-Monodův operonový model • Regulační význam cAMP u bakterií • Variace operonového řízení genů • Tryptofanový a arabinosový operon • Řízení terminace transkripce • Regulace bakteriální proteosyntézy na úrovni translace • Řízení genové exprese a proteosyntézy u eukaryot • Regulace na úrovni uspořádání genů • Regulace na úrovni transkripce • Regulace posttranskripčních úprav pre-mRNA • Regulace na úrovni translace • Řízení rychlosti degradace mRNA • Regulace funkce proteinu kotranslačními a posttranslačními úpravami

Posttranslační úpravy a targeting proteinů: Signální sekvence polypeptidu, volné a vázané ribozómy • Posttranslační glykosylace proteinů • Targeting nezávislý na glykosylaci proteinů • Targeting mitochondriálních proteinů • Targeting jaderných proteinů • Rozhodovací mechanismus k destrukci nefunkčních proteinů • Receptorem zprostředkovaná endocytóza

Biochemie virů: Reprodukce DNA virů • Reprodukce RNA virů • Interferony

Biochemie genového inženýrství: Štěpení DNA na definovaném místě řetězce • Účinné dělení fragmentů DNA elektroforézou • Identifikace restrikčních fragmentů • Syntéza umělé DNA • Pomnožení a exprese izolovaného nebo umělého genu v hostitelské buňce