

Klonování a sekvenování přírodní DNA – základ pro fylogenetickou analýzu společenstva

Iva Buriánková
Katedra ekologie
PŘF UP



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

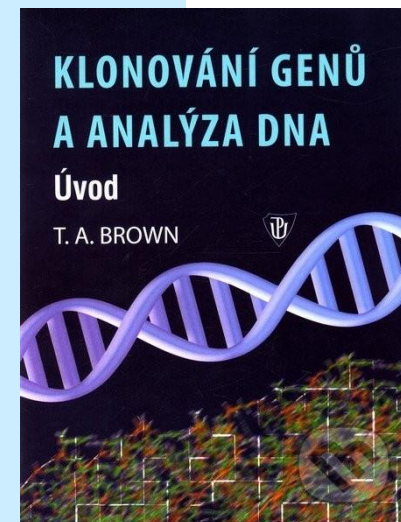
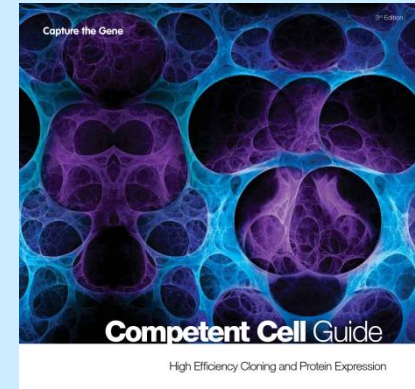
KLONOVÁNÍ GENŮ



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

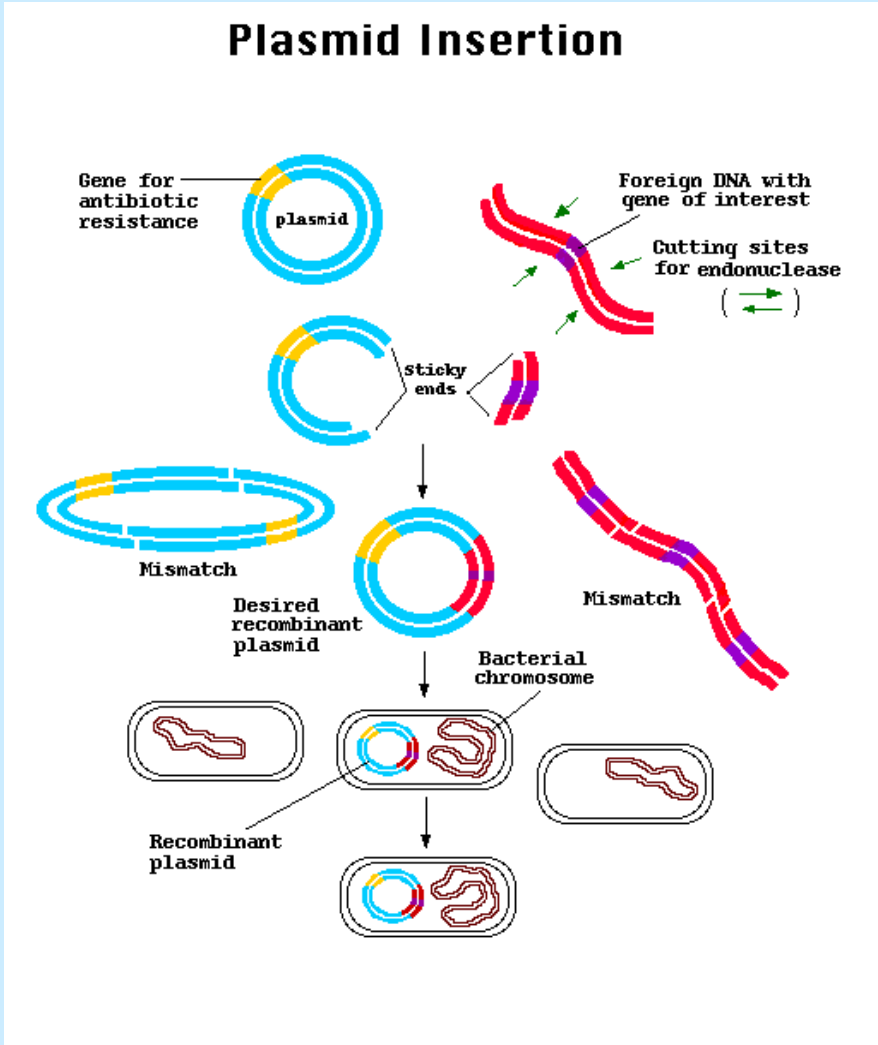
KLONOVÁNÍ GENŮ

- Klonování genů patří mezi moderní a velmi perspektivní molekulární metody
- získání čistého vzorku jednotlivého genu, odděleného od všech ostatních genů v buňce
- Principem klonování genů je vytvoření mnoha kopií cílového genu díky přirozenému množení hostitelských buněk
- Úsek DNA, který chceme klonovat, je vložen do kružnicové molekuly DNA zvané vektor - vzniká tzv. rekombinantní molekula DNA
- čistý gen může být dále sekvenován (tj. určí se přesné pořadí nukleotidů v sekvenci) a porovná s daty uloženými v mezinárodní bance klonů
- přiřazení klonu k již známým klonům (podle vzájemné podobnosti nukleotidových sekvencí) a vytvoření fylogenetického stromu.



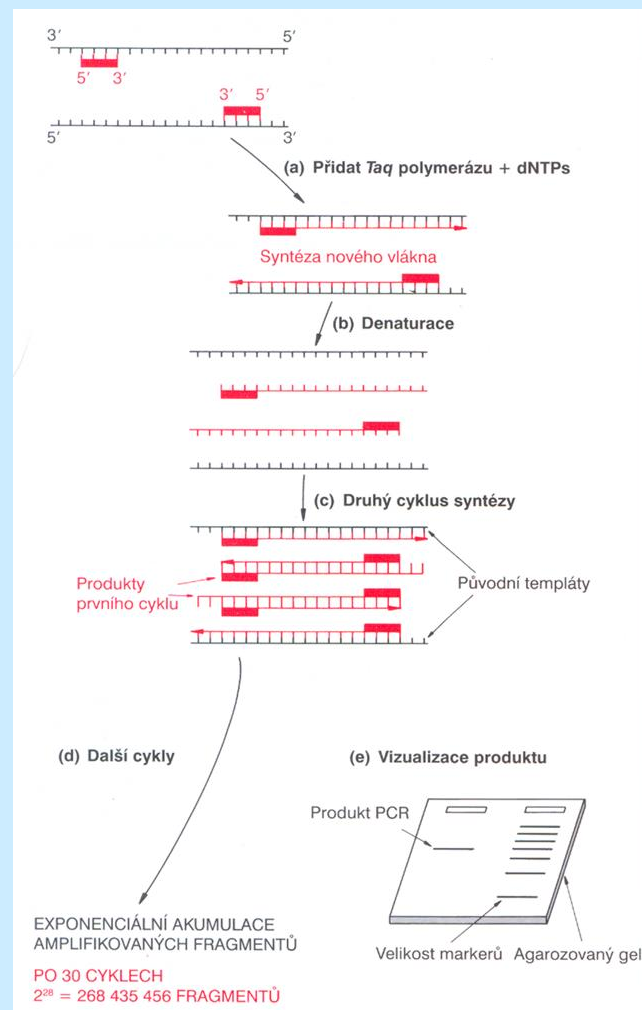
BIO LINE
A Division of Becton Dickinson

- Vektor je přenesen do hostitele (zpravidla bakterie), kde se pomnoží a produkuje velké množství vlastních kopií a zároveň kopií genu, který nese
- Množením hostitelských buněk se do dceřiných buněk přenáší i kopie rekombinantní DNA, kde opět dochází k replikaci
- Po mnohonásobném dělení vzniká kolonie neboli klon identických hostitelských buněk. Každá buňka klonu obsahuje jednu nebo více kopií molekuly rekombinantní DNA - gen, nesený rekombinantní molekulou DNA, se pak nazývá klonovaný.



PCR

- cyklicky namnoží vybrané úseky vyizolované DNA
- Purifikace získané DNA, díky které byly odstraněny zbytky chemikálií a nukleotidů



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

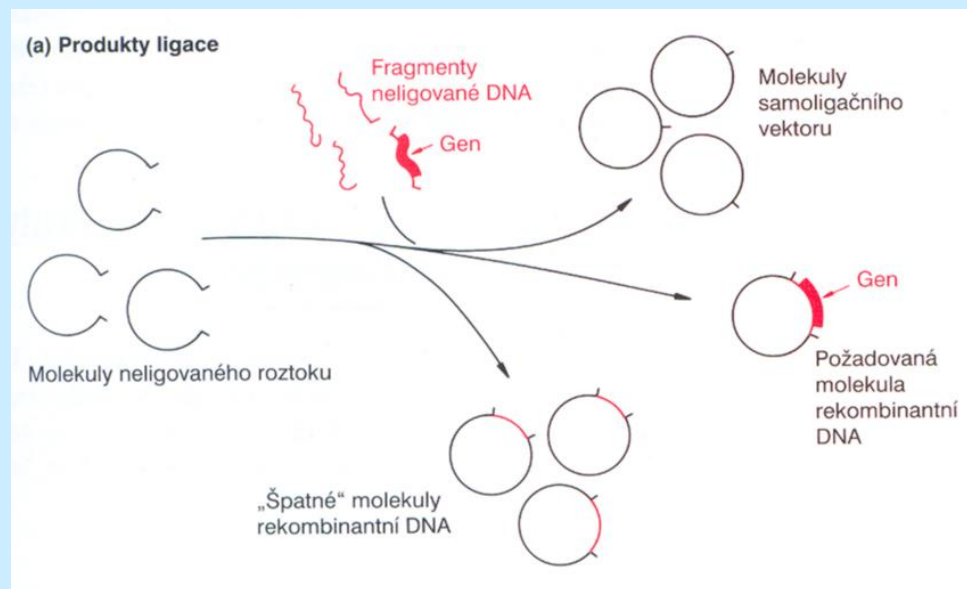
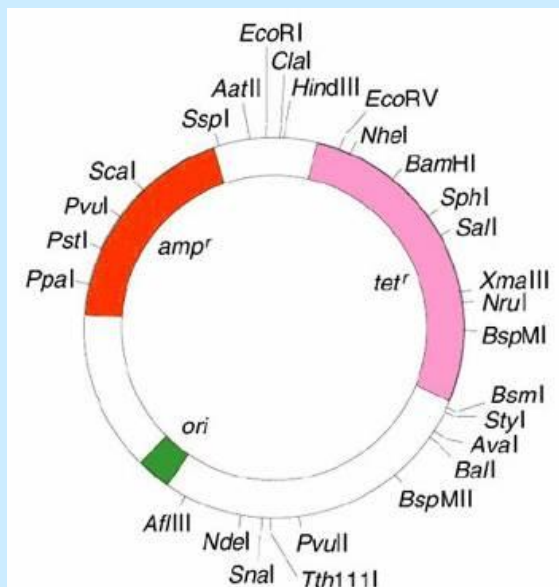


OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

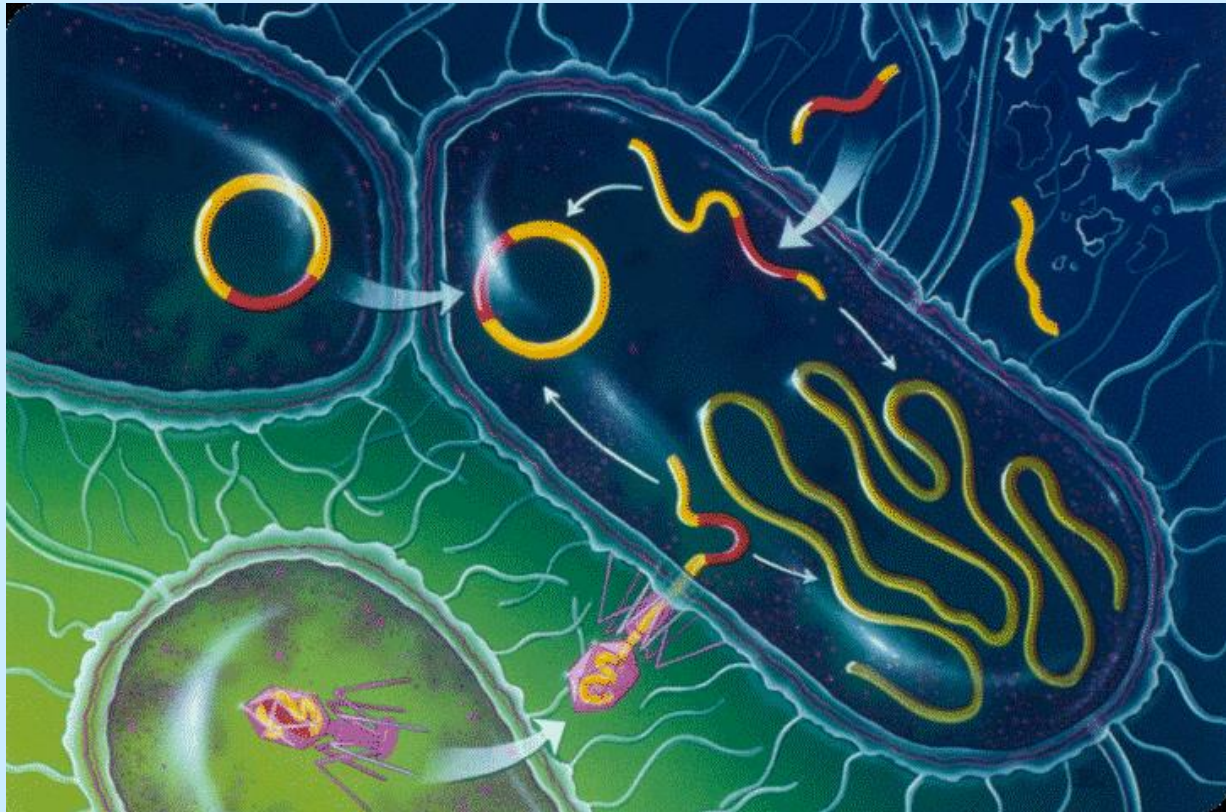
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Vložení PCR produktů do klonovacího vektoru

- Zpurifikované fragmenty DNA byly vloženy do plazmidových vektorů (pUC8) (vznik tzv. rekombinantní DNA molekuly)
- vektor transportován do hostitelské buňky *E. coli* (tzv. transformace)
- horizontální přenos genetické informace není v přírodě pravděpodobně běžným procesem



Bakteriální plazmidy (malé kruhové molekuly) obvykle nesou malé množství celkové DNA (cca 5%), která není pro základní životní pochody nezbytná, ale přináší obvykle jisté selektivní výhody - například rezistenci k antibiotiku



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

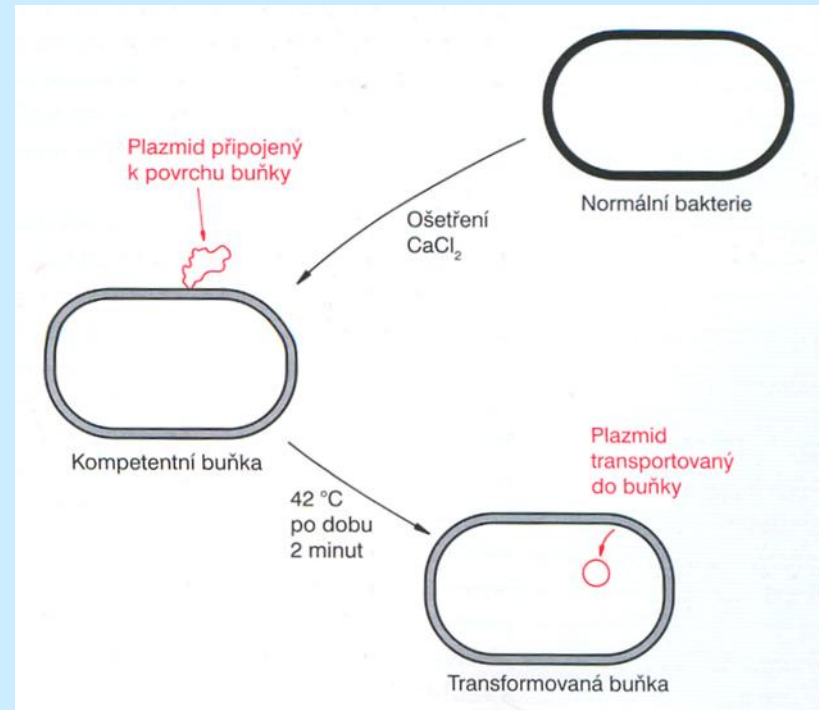


OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Příjem molekuly DNA kompetentní bakteriální buňkou

- Abychom zvýšili schopnost bakterií přijmout DNA, je nutné je chemicky i fyzikálně upravit.
- Buňky se připravují v roztoku solí (CaCl_2) - tzv. kompetentní buňky a pohyb molekul DNA do nich je stimulován krátkodobým zvýšením teploty na 42°C .



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

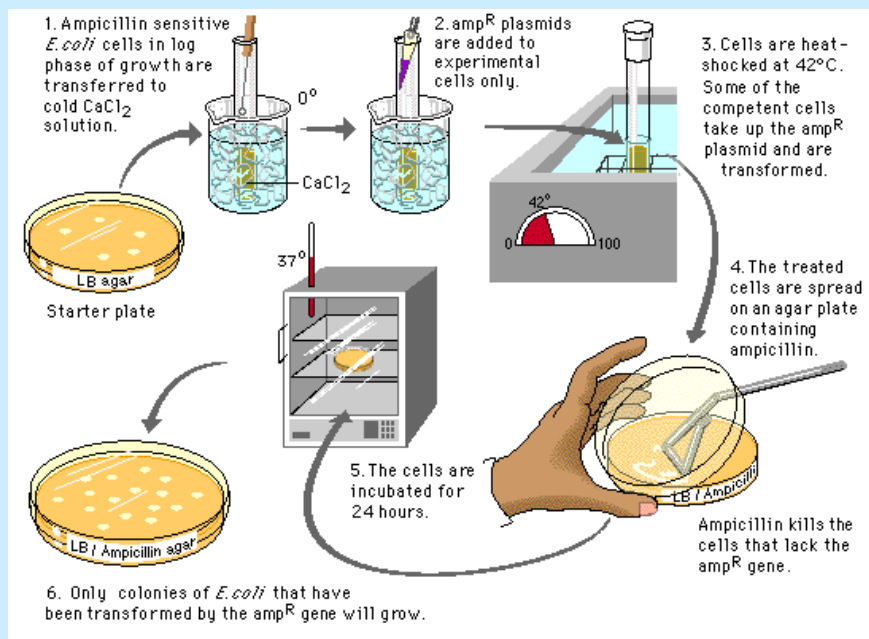


OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Kultivace kompetentních buněk

- Vzorčky kompetentních bakterií *E.coli* s plasmidy byly nanесeny na agarovou plotnu a inkubovány přes noc
- Následující den je nutné vybrané kolonie (nesoucí jeden klon) přeočkovat na čistou půdu.



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



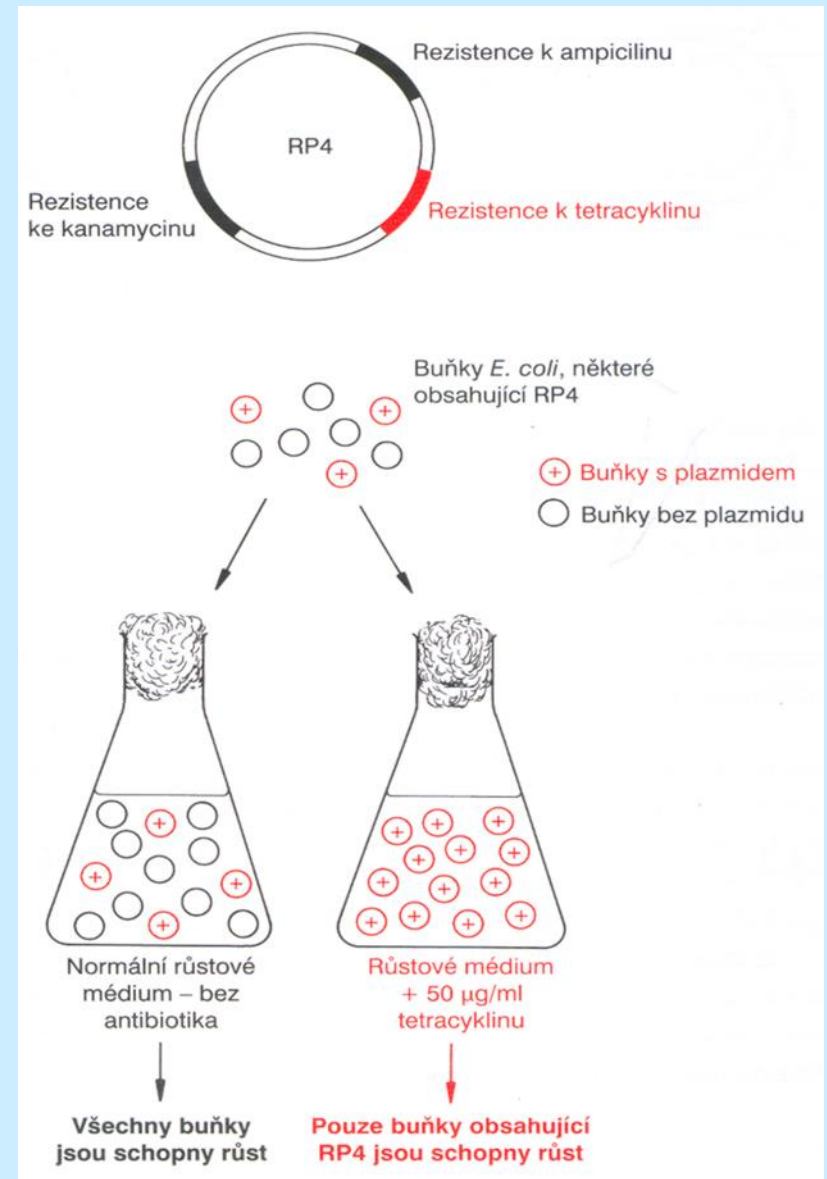
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

- 5. Dvojitá selekce – I. antibiotikum
- K rozlišení kolonií, které jsou tvořeny transformovanými buňkami se používá systém dvojitá selekce
- Může se totiž stát, že bakterie nepřijmou nabízený plazmid
- nebo přijmou plazmid, který nenesé náš segment DNA



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Dvojitá kontrola na těžce agarové plotně

První selekce spočívá v tom, že plazmid obsahuje gen k získání rezistence k antibiotiku, které se přidává do agarů, tzn. že vyrostou pouze kolonie bakterií, které plazmid přijaly.



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

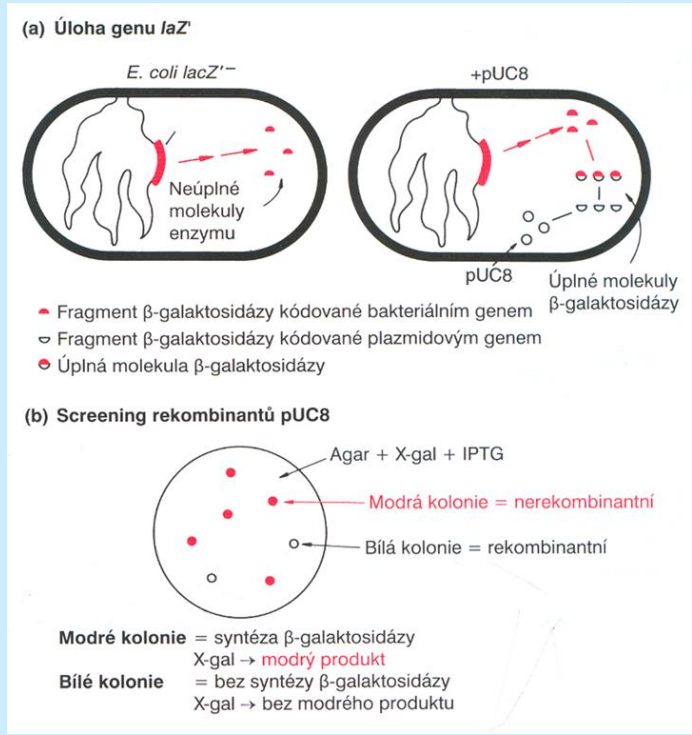


OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Dvojitá selekce - II. princip inzerční inaktivace genu lacZ'

- principu narušení integrity určitého genu v klonovacím vektoru poté, co inkorporoval fragment DNA.
- Narušení integrity genu se projeví tím, že buňka přestane vykazovat nějakou vlastnost.
- vektor pUC8 nese gen lacZ', kódující část enzymu β-galaktosidázy, který je běžnou součástí genetické výbavy *E.coli* a je nutný ke štěpení laktózy.



- Pro klonování je však použit modifikovaný bakteriální kmen, který postrádá právě tu část segmentu genu lacZ', která je nesena plazmidem.
- Takto modifikované kmeny mohou syntetizovat β -galaktosidázu pouze v případě, že přijmou plazmid.
- Agarová půda obsahuje analog laktózy (X-gal), který je rozkládán enzymem β -galaktosidázou za vzniku modrého barviva.

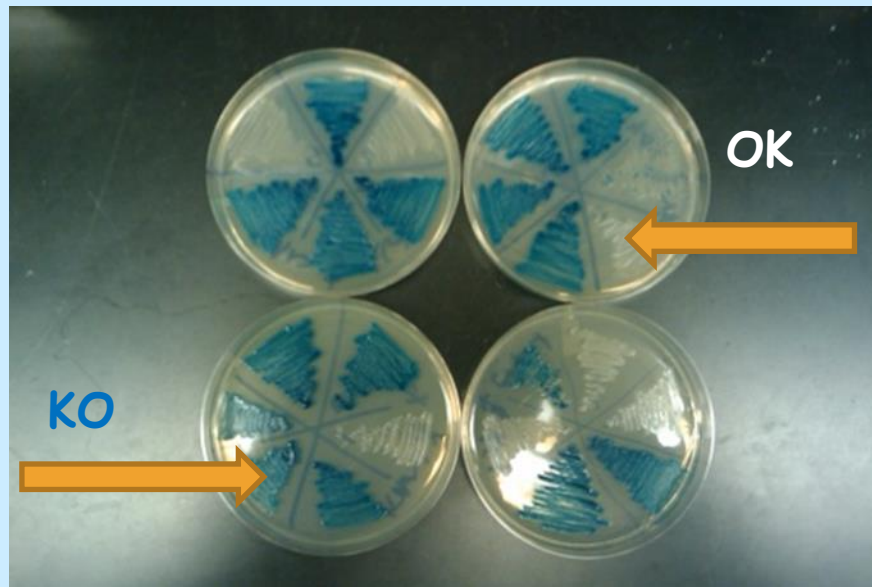


- Výsledkem tedy je, že na agarové plotně jsou kolonie bílé a modré. Modré jsou tvořeny bakteriemi, které přijaly plazmid bez inkorporovaného segmentu DNA - nedošlo k porušení integrity genu lacZ', byla syntetizována β -galaktosidáza a štěpena laktóza za vzniku modrého barviva.



Bílé kolonie představují bakterie, které přijaly plazmid s rekombinantní molekulou DNA, došlo tedy k narušení integrity genu *lacZ'* a nebyla syntetizována β -galaktosidáza ani štěpena laktóza.

Bílé kolonie bakterií, nesoucí v plazmidech rekombinantní molekulu DNA, jsou potom cílové pro sekvenační analýzy. Tento systém se také nazývá modro/bílá selekce.



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

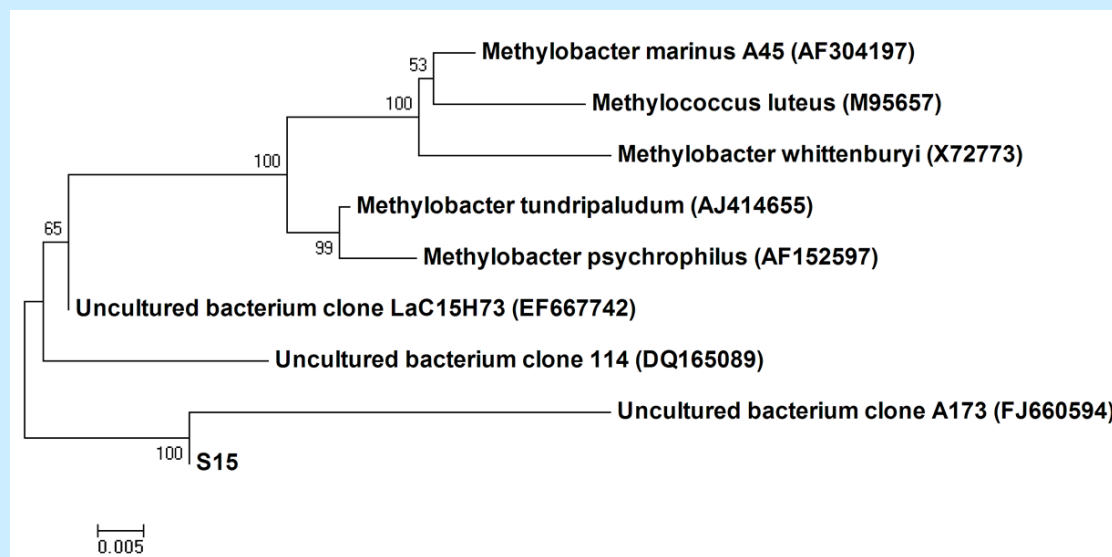


OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

7. Konstrukce fylogenetického stromu – metanotrofní bakterie

- Výsledné nalezené sekvence patřící metanotrofům byly následně porovnány s databázemi klonových knihoven a dle míry podobnosti byl zkonstruován fylogenetický strom.



Fylogenetická pozice sekvence 16S rRNA genu (S15) získaná z hyperheického sedimentu toku Sitka.



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

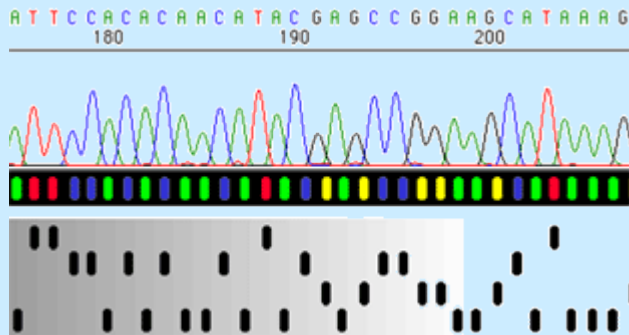


OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

EKO/MEM – Molekulární ekologie mikroorganismů

SEKVENOVÁNÍ DNA a základy bioinformatiky



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Úvod – DNA

První zmínka – „nuclein“

- Friedrich Miescher 1869 – z jader bílých krvinek izoloval směs různých látek bohatých na fosfát, kterou pojmenoval nuklein a skrývaly se za ní nukleové kyseliny DNA a RNA
- Hershey a Chase 1952 -potvrdili roli DNA v dědičnosti, Nobelova cenu za fyziologii a medicínu

Watson, Crick a Fraklinová

- Teoretický a experimentální důkaz struktury DNA



Watson a Crick

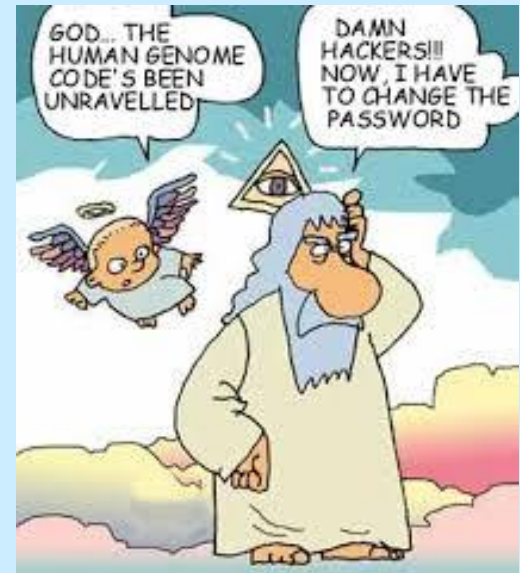


Rosalind Franklin



Úvod – sekvenování

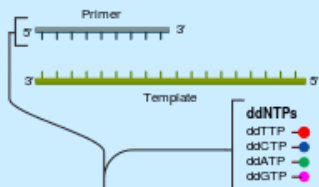
- Sangerovo sekvenování – 1977
- Sekvenování nové generace (next-gen sequencing – NGS)
 - 454 pyrosekvenování (Roche)
 - Illumina
 - A další....



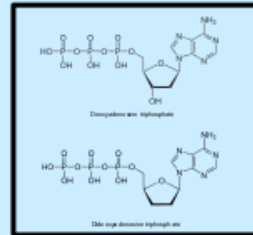
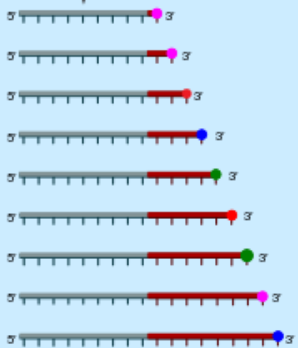
Sanger

1 Reaction mixture

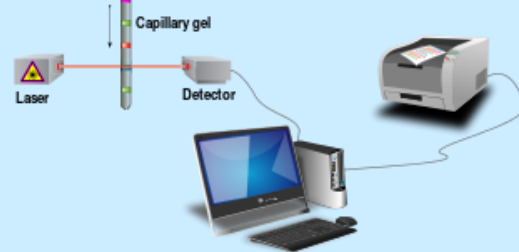
- Primer and DNA template
- DNA polymerase
- ddNTPs with flourochromes
- dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, and dTTP)



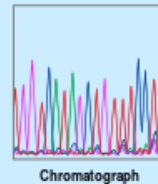
2 Primer elongation and chain termination



3 Capillary gel electrophoresis separation of DNA fragments

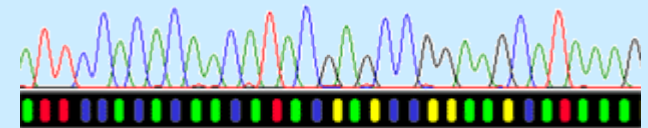


4 Laser detection of flourochromes and computational sequence analysis



- Chain termination method
- Součásti reakce
 - dNTPs (ATCG)
 - dideoxyNTPs (nemají 3'-OH skupinu, Značené fluorescenčně)
 - DNA polymeráza
 - 1 Primer
- Kapilární elektroforéza
- Detekce fluorochemů laserem
- Výsledek – chromatogram

A T T C C A C C A C A C A T A C G A G C C G G A R G C A T A A G
180 190 200



<https://www.youtube.com/watch?v=vK-HIMaitnE>

=vK-HIMaitnE



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



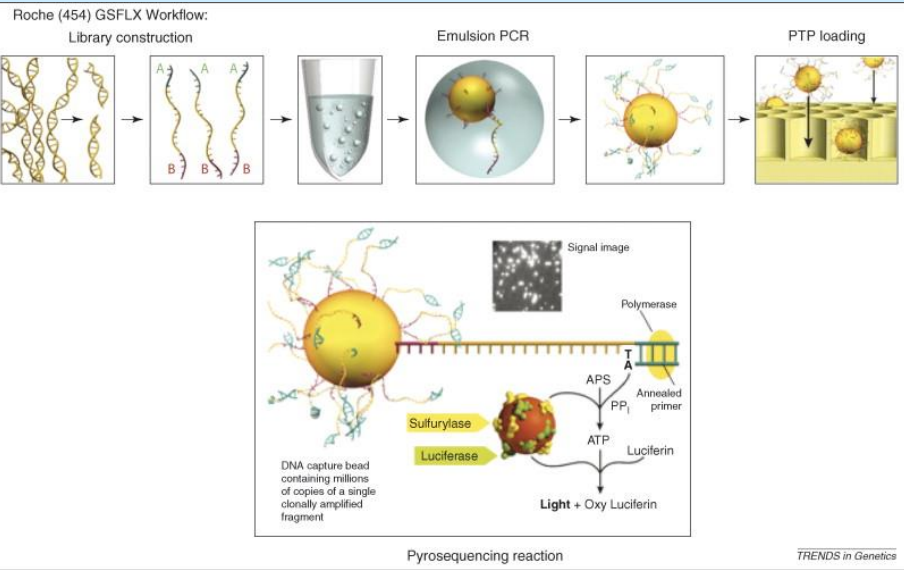
OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

454 pyrosekvenování

Pyrosekvenování je nová DNA sekvenační metoda založená na detekci pyrofosfátu, který je vedlejším produktem polymerizace DNA. Pyrofosfát vzniká poté co DNA polymeráza inkorporuje dNTP do prodlužujícího se primeru. Několika enzymatickými kroky je pyrofosfát konvertován na ATP které pohání luciferázovou reakci. Proto je pozorována světelná emise, když je do rostoucího řetězce DNA přidán další nukleotid.

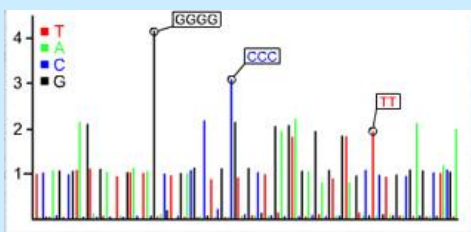


- než k samotnému sekvenování dojde, jsou jednotlivé fragmenty DNA umístěny na **streptavidinový substrát** a každý z těchto fragmentů je umístěn do speciálního **pikolitrového reaktoru**
- práce 4 enzymů – DNA polymerázy, ATP sulfurylázy, luciferázy a apyrázy.
- První reakcí je DNA polymerace pomocí DNA polymerázy, kdy dochází k **zařazení příslušného deoxynukleotid trifosfátu (dNTPs) za uvolnění pyrofosfátu** - uvolněn z polymerázy a může sloužit jako **substrát pro ATP sulfurylázu**-dojde ke kvantitativnímu **převedení pyrofosfátu na ATP**
- Během třetí a čtvrté reakce je **ATP převedeno na světelný signál pomocí enzymu luciferázy** a následně je světelný **signál detekován** a vyhodnocen programem.
- Poslední je **reakce apyrázy, která odstraní nezainkorporované nukleotidy a ATP**, aby následně mohlo dojít k zopakování celého výše popsáního procesu
- paralelně probíhá obrovské množství sekvenovacích procesů najednou a výsledek je čten počítačem.

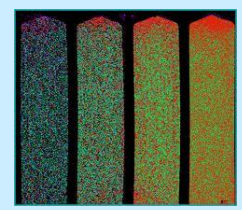
fragmenty DNA – genomická DNA, PCR produkt na každý jednotlivý fragment DNA napojeny **adaptry**

adaptry vážou fragment na **capture beads** (1 fragment → 1 bead)

emulzní PCR (emPCR) – na každé **bead** proběhne **klonální** amplifikace fragmentu → namnožení daného typu molekuly DNA



Flowgram



Snímek pikotitrační destičky

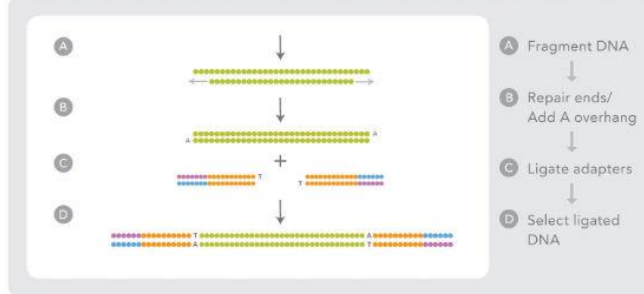
Mateřské mléko – cca 700 druhů bakterií, složení mikrobiomu v mateřském mléce ovlivňuje i fyziologický stres a hormony

Illumina

Simple, Automated Workflow

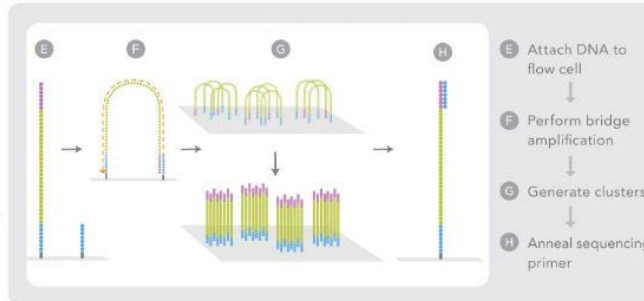
1 Library Prep

6 hours 3 hours hands-on time



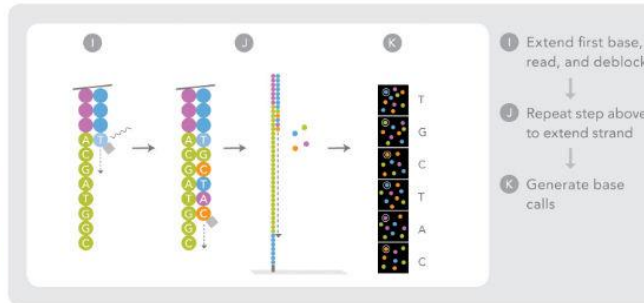
2 Cluster Generation

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



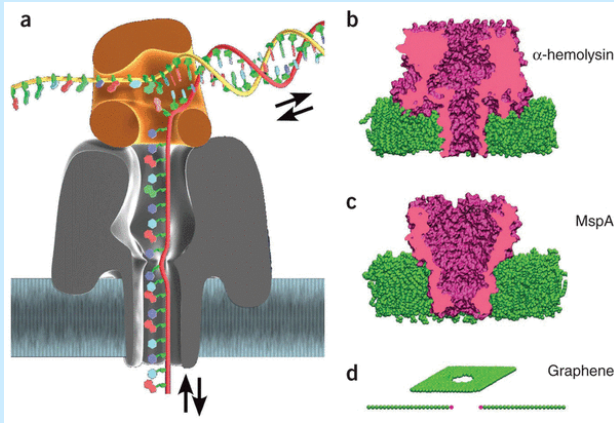
3 Sequencing

2-3 days (single-read)
4-6 days (paired-end)
30 min. hands-on time (1-8 Samples)



©2008, Illumina Inc. All rights reserved.

Oxford Nanopore Technologies (zajímavost)



- technologie nanopórů využívají velmi tenkých otvorů na molekulární úrovni, jimiž prochází zkoumaný řetězec DNA
- v nanopóru jsou navíc umístěny drobné elektrody
- jak každý ze čtyř nukleotidů ovlivňuje svým vlastním specifickým způsobem proud elektronů mezi elektrodami, je možné velmi rychle určit pořadí procházejících nukleotidů



- Sekvenování pomocí změny napětí v nanopóru
- Vysoká chybovost!!!
- Ale předpokládá se vylepšení.

Porovnání NGS a Sanger

Sequencer	454 GS FLX	HiSeq 2000	SOLiDv4	Sanger 3730xl
Sequencing mechanism	Pyrosequencing	Sequencing by synthesis	Ligation and two-base coding	Dideoxy chain termination
Read length	700 bp	50SE, 50PE, 101PE	50 + 35 bp or 50 + 50 bp	400~900 bp
Accuracy	99.9%*	98%, (100PE)	99.94% *raw data	99.999%
Reads	1 M	3 G	1200~1400 M	—
Output data/run	0.7 Gb	600 Gb	120 Gb	1.9~84 Kb
Time/run	24 Hours	3~10 Days	7 Days for SE 14 Days for PE	20 Mins~3 Hours
Advantage	Read length, fast	High throughput	Accuracy	High quality, long read length
Disadvantage	Error rate with polybase more than 6, high cost, low throughput	Short read assembly	Short read assembly	High cost low throughput

Liu et al. 2012

Porovnání NGS a Sanger

Sequencers	454 GS FLX	HiSeq 2000	SOLiDv4	3730xl
Instrument price	Instrument \$500,000, \$7000 per run	Instrument \$690,000, \$6000/(30x) human genome	Instrument \$495,000, \$15,000/100 Gb	Instrument \$95,000, about \$4 per 800 bp reaction
CPU	2* Intel Xeon X5675	2* Intel Xeon X5560	8* processor 2.0 GHz	Pentium IV 3.0 GHz
Memory	48 GB	48 GB	16 GB	1 GB
Hard disk	1.1 TB	3 TB	10 TB	280 GB
Automation in library preparation	Yes	Yes	Yes	No
Other required device	REM e system	cBot system	EZ beads system	No
Cost/million bases	\$10	\$0.07	\$0.13	\$2400

Liu et al. 2012



Proč sekvenovat?

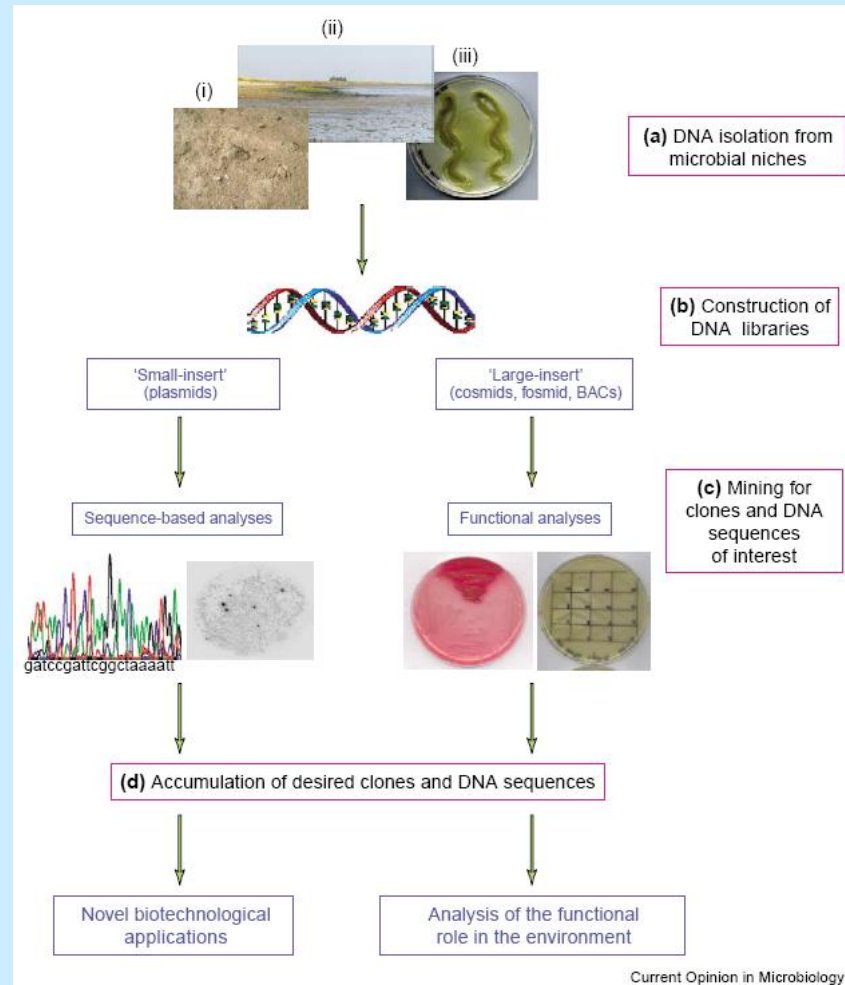
- Identifikace druhů - popis společenstva
- Barcoding
- Rekonstrukce evoluce
- Popis metabolismu v rámci společenstva

Problémy mikroorganismů

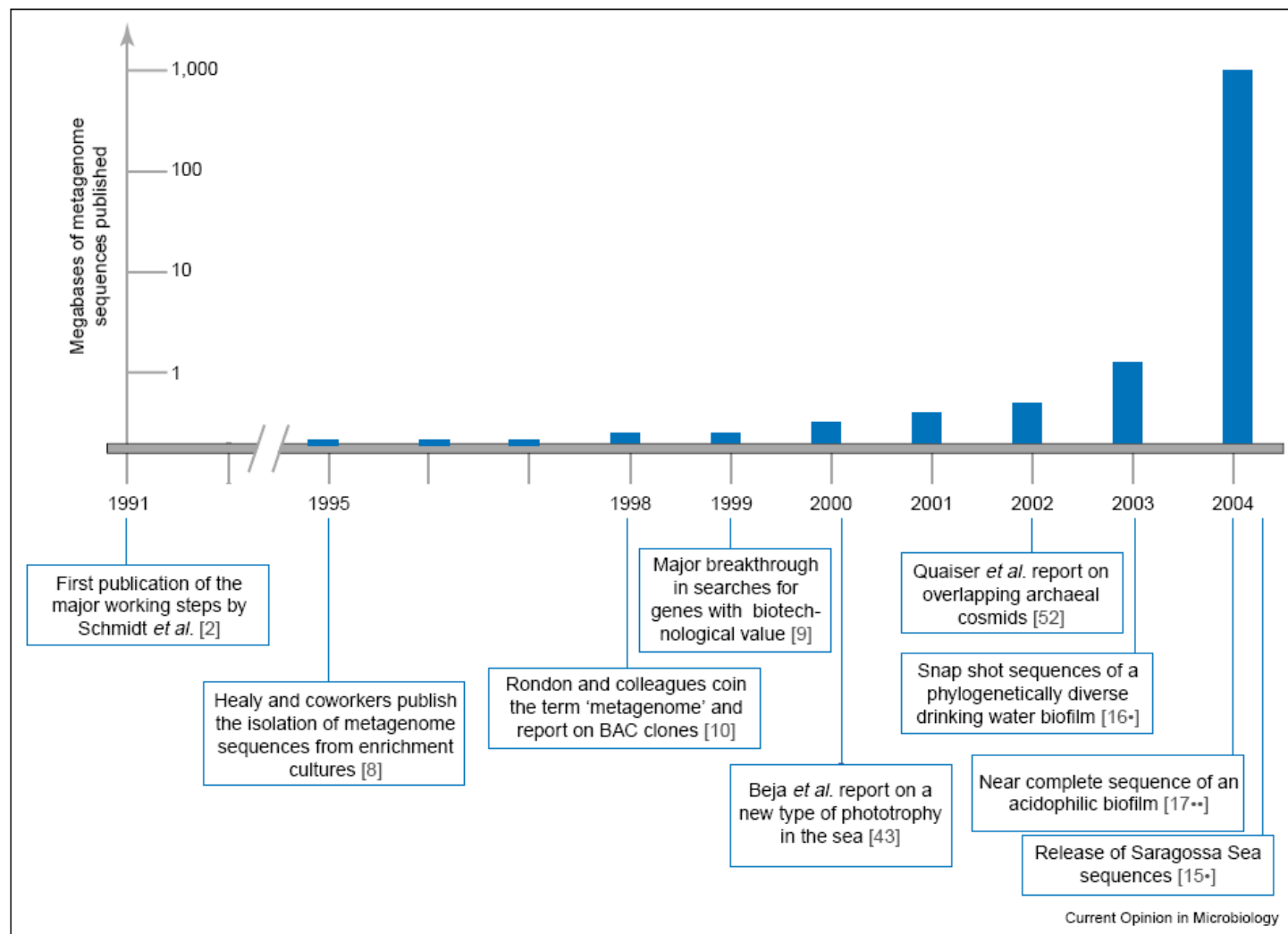
- Malé rozměry – menší než 1 mm
- Vysoká druhová diversita – jen bakterie mohou mít miliardu druhů
- Vysoká metabolická diversita
- Jen malá část se dá kultivovat

Metagenomika

Klonování x NGS

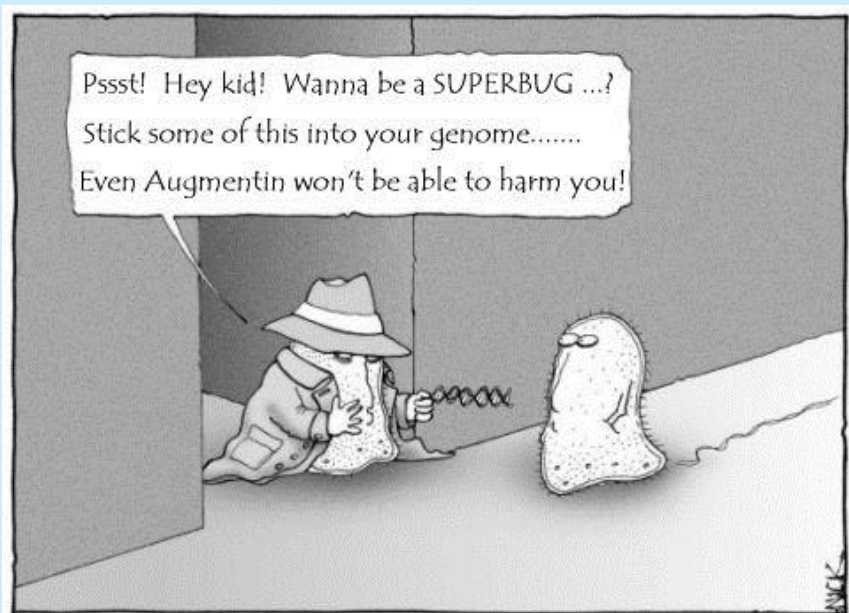


Vývoj počtu sekvencí získaných metagenomickým přístupem



Sequence-based analýza pomocí klonování

- Počet získaných sekvencí – desítky až stovky
- Sangerovo sekvenování
- Vysoká přesnost, dlouhá čtení



It was on a short cut through the hospital kitchens that Albert was first approached by a member of the Antibiotic Resistance.



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



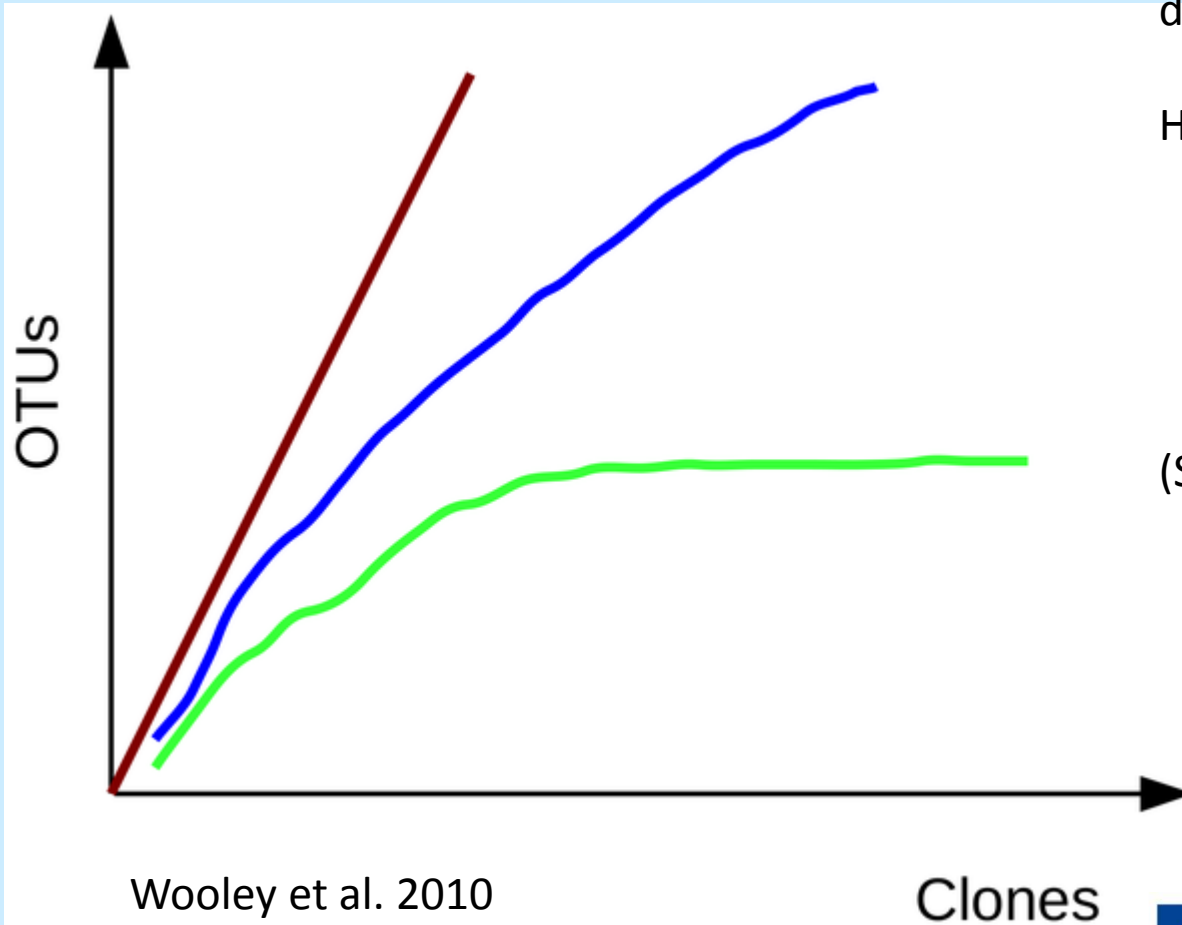
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Kolik je dost? Kolik sekvencí je potřeba k popisu společenstva



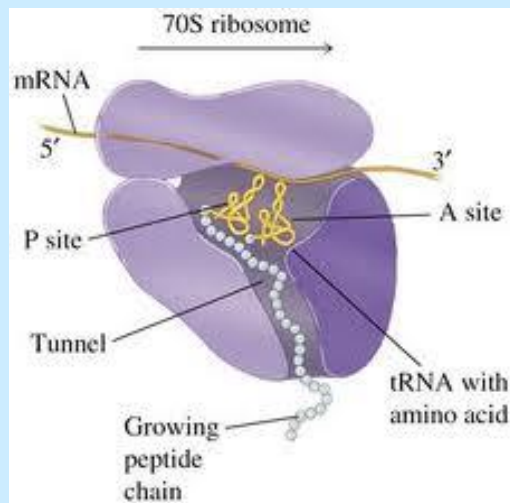
Nedostatečné vzorkování, většina diversity nepopsaná

Habitat nedostatečně vzorkován

(Skoro) všechny druhy popsány

Molekulární markery používané v metagenomice

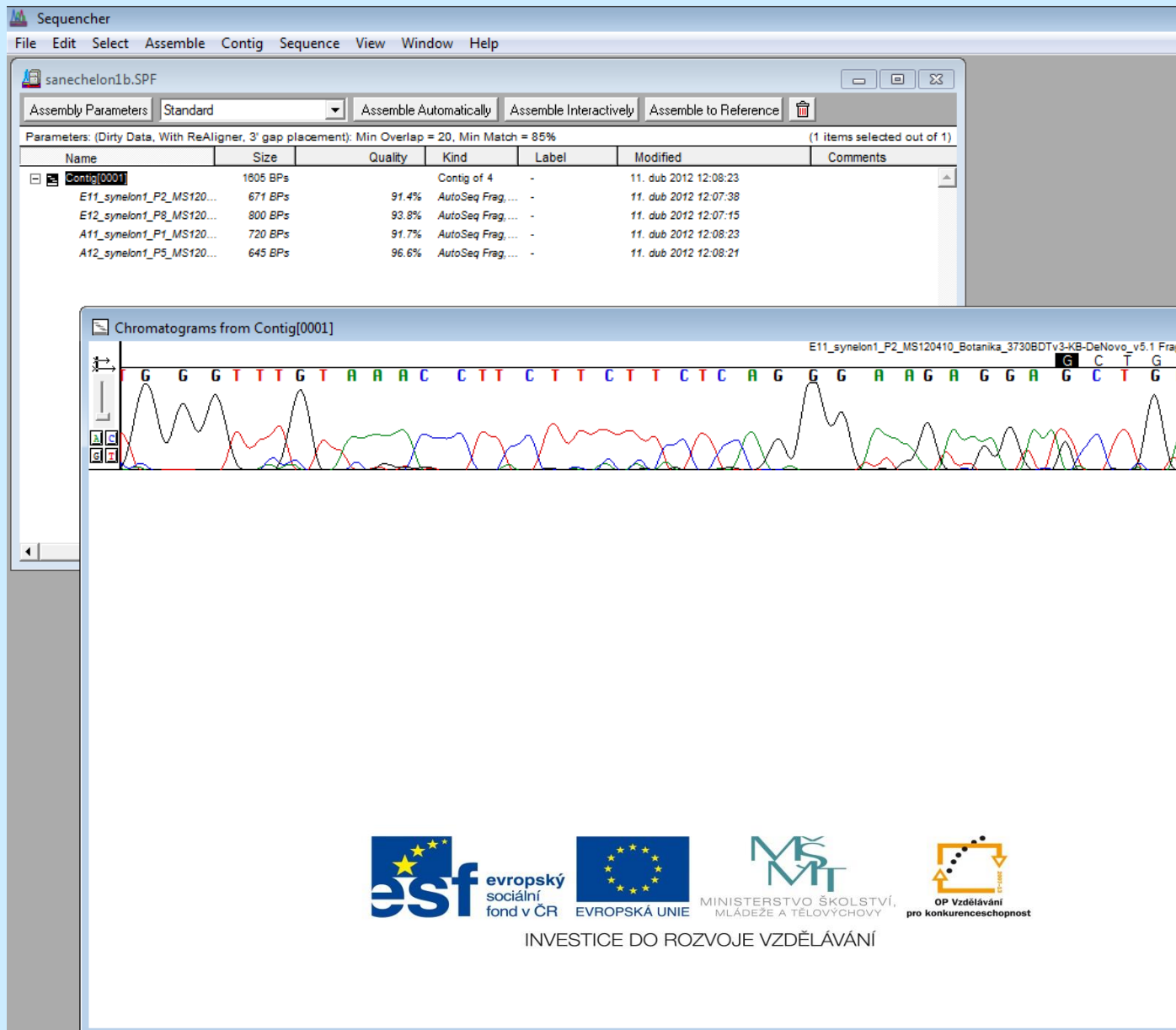
- Prokaryota – 16S rRNA, mcrA
- Eukaryota – 18S rRNA, 28S rRNA, COI, rbcL
- 16S rRNA, 18S rRNA – ribozomální RNA
 - Podléhá málo mutacím – základ metabolismu
 - V každém organismu
 - Nekóduje protein – často se vyskytují mezery



Iniciální zpracování sekvencí

- Čtení chromatogramu
- Assembly
- Ořezání – trimming
- Proofreading
- Export

Čtení chromatogramu Sequencher 5.1



The screenshot displays the Sequencher 5.1 interface. At the top, the menu bar includes File, Edit, Select, Assemble, Contig, Sequence, View, Window, and Help. Below the menu, the file name 'sanechelon1.b.SPF' is shown. The 'Assembly Parameters' section is set to 'Standard' with options for 'Assemble Automatically', 'Assemble Interactively', and 'Assemble to Reference'. The parameters are: 'Parameters: (Dirty Data, With ReAligner, 3' gap placement): Min Overlap = 20, Min Match = 85% (1 items selected out of 1)'. A table lists the contigs:

Name	Size	Quality	Kind	Label	Modified	Comments
Contig[0001]	1605 BPs		Contig of 4	-	11. dub 2012 12:08:23	
E11_synelon1_P2_MS120...	671 BPs	91.4%	AutoSeq Frag...	-	11. dub 2012 12:07:38	
E12_synelon1_P8_MS120...	800 BPs	93.8%	AutoSeq Frag...	-	11. dub 2012 12:07:15	
A11_synelon1_P1_MS120...	720 BPs	91.7%	AutoSeq Frag...	-	11. dub 2012 12:08:23	
A12_synelon1_P5_MS120...	645 BPs	96.6%	AutoSeq Frag...	-	11. dub 2012 12:08:21	

The main window shows 'Chromatograms from Contig[0001]'. The chromatogram displays a sequence of nucleotides: G G G T T T G T A A A C C T T C T T C T T C T C A G G G A A G A G G A G C T G A. Below the sequence, the chromatogram shows four colored traces (red, green, blue, black) representing the peaks for each nucleotide. The sequence is highlighted in black, and the chromatogram shows a clear peak for the highlighted 'G' at the end of the sequence.



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Čtení chromatogramu Sequencher 5.1

Sequencher

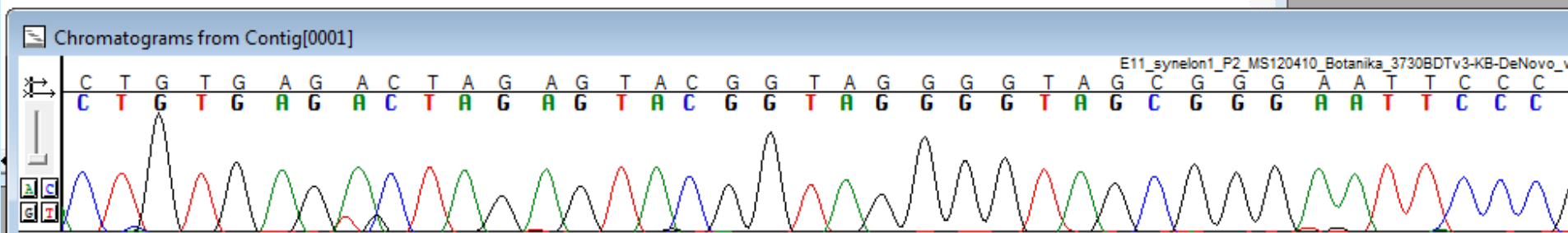
File Edit Select Assemble Contig Sequence View Window Help

sanechelon1b.SPF

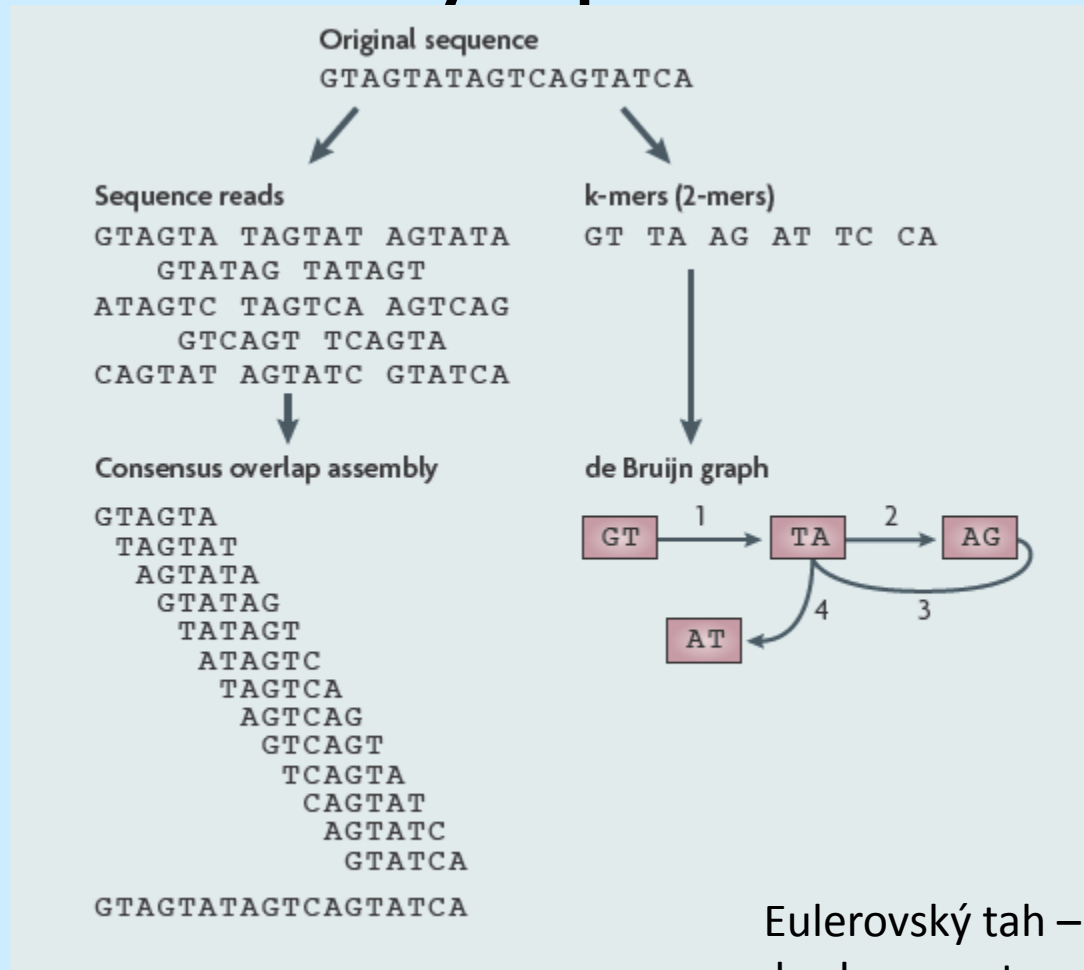
Assembly Parameters: Standard Assemble Automatically Assemble Interactively Assemble to Reference

Parameters: (Dirty Data, With ReAligner, 3' gap placement): Min Overlap = 20, Min Match = 85% (1 items selected out of 1)

Name	Size	Quality	Kind	Label	Modified	Comments
Contig[0001]	1605 BPs		Contig of 4	-	11. dub 2012 12:08:23	
E11_synelon1_P2_MS120...	671 BPs	91.4%	AutoSeq Frag,...	-	11. dub 2012 12:07:38	
E12_synelon1_P8_MS120...	800 BPs	93.8%	AutoSeq Frag,...	-	11. dub 2012 12:07:15	
A11_synelon1_P1_MS120...	720 BPs	91.7%	AutoSeq Frag,...	-	11. dub 2012 12:08:23	
A12_synelon1_P5_MS120...	645 BPs	96.6%	AutoSeq Frag,...	-	11. dub 2012 12:08:21	



Assembly - poskládání



- Výpočetně náročnější
- Nevýhodné pro krátká čtení

- Výpočetně méně náročné
- Výhodné pro krátká čtení

<http://gcat.davidson.edu/phast/debruijn.html>

Eulerovský tah – jak spojit všechny body v prostoru jedním tahem?
(Eulerian path)



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



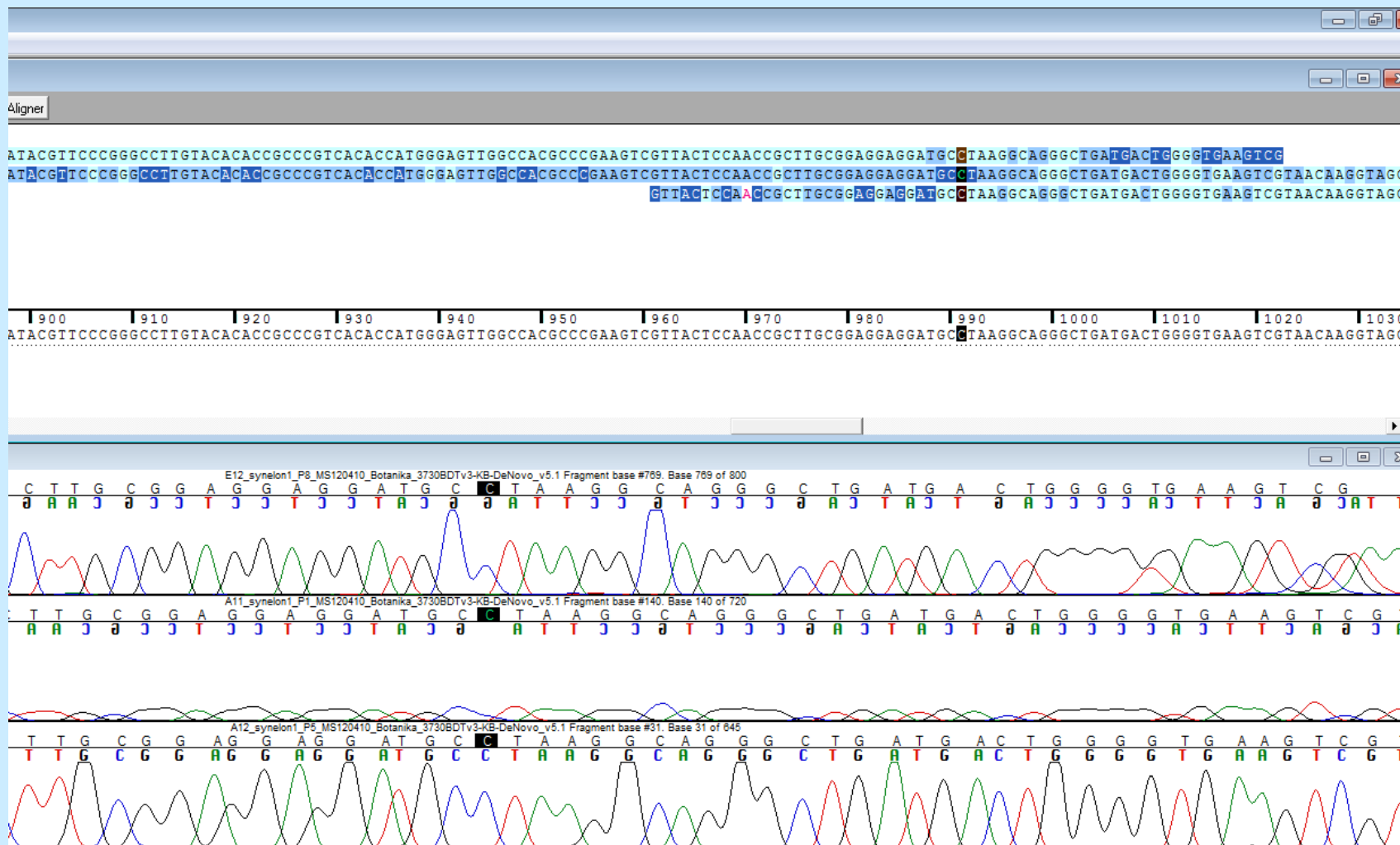
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Assembly - poskládání



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKA UNIE



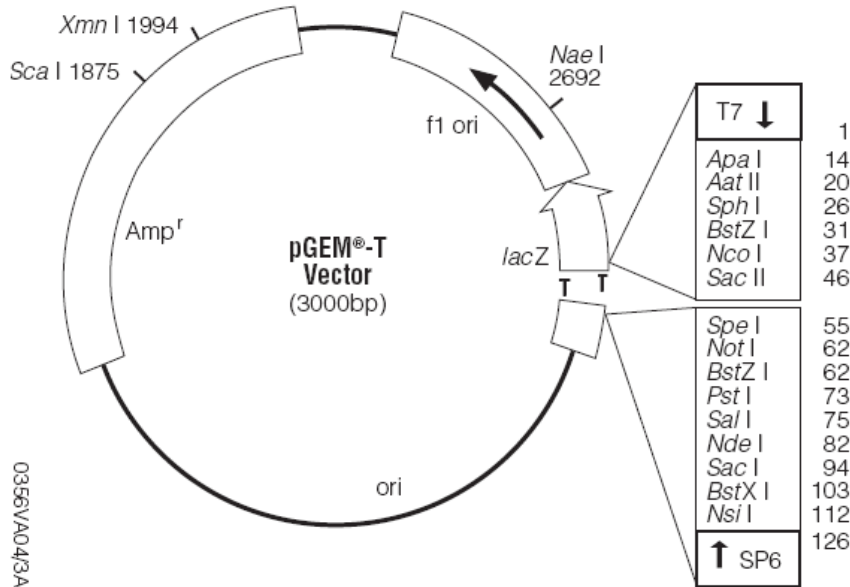
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Ořezání – trimming

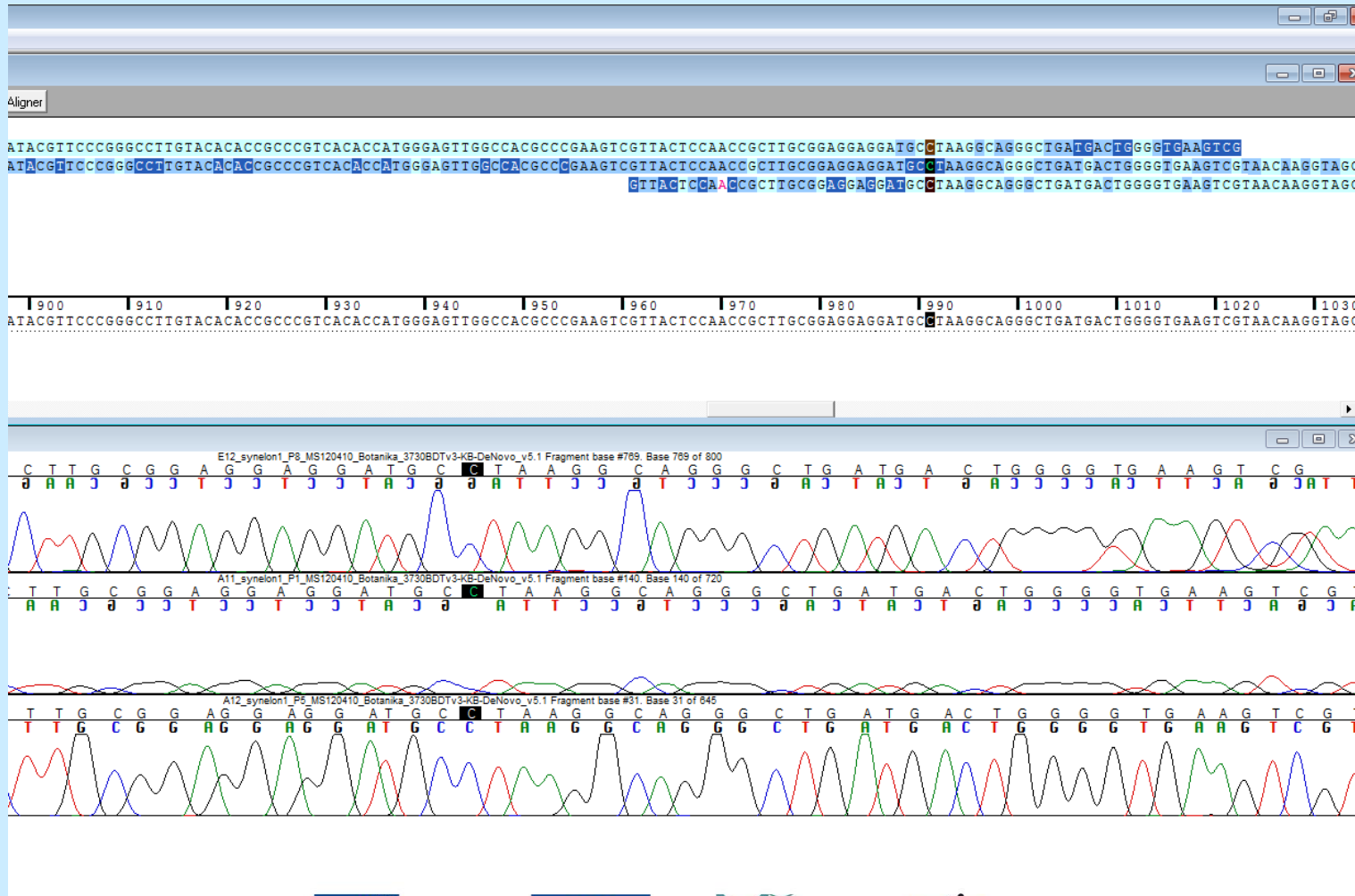


pGEM®-T Vector Sequence reference points:

T7 RNA Polymerase transcription initiation site	1
multiple cloning region	10–113
SP6 RNA Polymerase promoter (–17 to +3)	124–143
SP6 RNA Polymerase transcription initiation site	126
pUC/M13 Reverse Sequencing Primer binding site	161–177
<i>lacZ</i> start codon	165
<i>lac</i> operator	185–201
β -lactamase coding region	1322–2182
phage f1 region	2365–2820
<i>lac</i> operon sequences	2821–2981, 151–380
pUC/M13 Forward Sequencing Primer binding site	2941–2957
T7 RNA Polymerase promoter (–17 to +3)	2984–3

Ořezání primerů, vektorů apod.

Proofread – manuální oprava sekvencí



evropský
sociální
fond v ČR



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



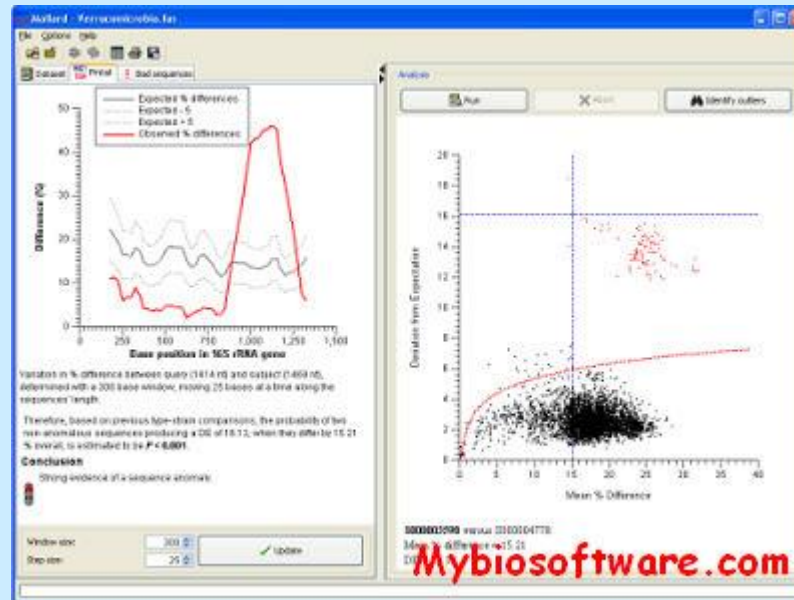
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Chiméry



- Artefakty vzniklé při PCR
- Většinou vznikají nekompletní extenzí primerů
- Takto vzniklé prodloužené primery se navazují na různé templáty a vznikají chimerické sekvence
- Další minoritní důvody vzniku:
 - Nízká procesivita polymerázy (málo navázaných bází)
 - Špatně vložené nukleotidy
 - A další....
- Jak odhalit chiméru? Bioinformatika...

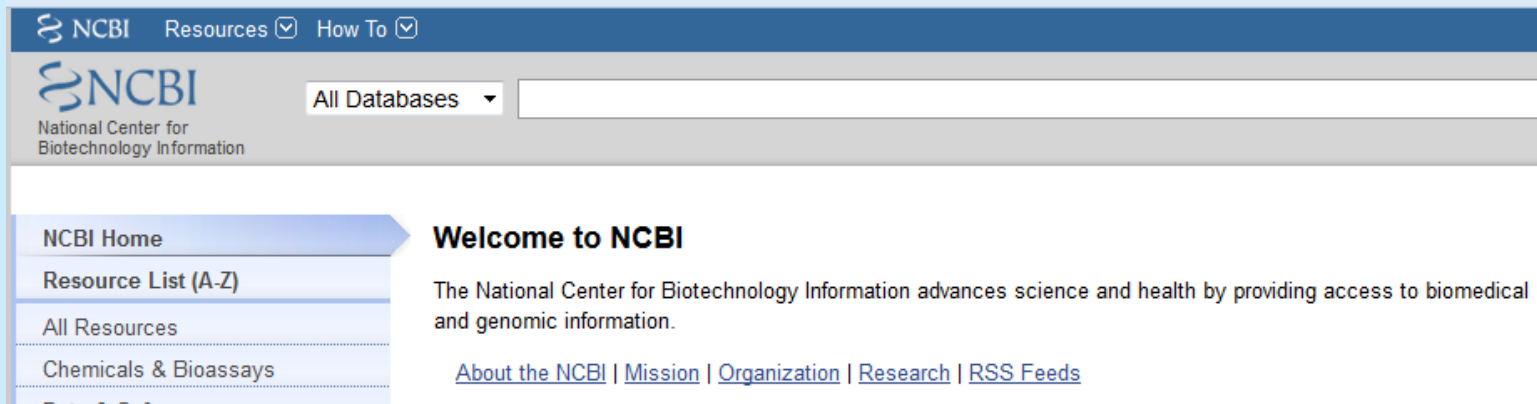
Chiméry



Detekce chimér pomocí program Mallard (Ashelford et al. 2006)

Databáze GenBank

- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Obsahuje kompletně všechny sekvence DNA, i z různých dalších databází
- Poskytuje vše bezplatně
- Obsahuje velké množství nástrojů na práci se sekvencemi
- Při publikaci je nutné použité sekvence publikovat v této databázi








The screenshot shows the NCBI website homepage. At the top, there is a navigation bar with 'NCBI Resources' and 'How To' links. Below this is the NCBI logo and the text 'National Center for Biotechnology Information'. A search bar is visible with a dropdown menu set to 'All Databases'. On the left side, there is a vertical menu with links to 'NCBI Home', 'Resource List (A-Z)', 'All Resources', 'Chemicals & Bioassays', and 'Data & Software'. The main content area features a 'Welcome to NCBI' message, stating that the center advances science and health by providing access to biomedical and genomic information. Below the welcome message are links for 'About the NCBI', 'Mission', 'Organization', 'Research', and 'RSS Feeds'.
















Search across databases





[Help](#)

- Result counts displayed in gray indicate one or more terms not found

-  **PubMed:** biomedical literature citations and abstracts
-  **PubMed Central:** free, full text journal articles
-  **Site Search:** NCBI web and FTP sites

-  **Books:** online books
-  **OMIM:** online Mendelian Inheritance in Man

-  **Nucleotide:** Core subset of nucleotide sequence records
-  **EST:** Expressed Sequence Tag records
-  **GSS:** Genome Survey Sequence records
-  **Protein:** sequence database
-  **Genome:** whole genome sequences
-  **Structure:** three-dimensional macromolecular structures
-  **Taxonomy:** organisms in GenBank
-  **SNP:** short genetic variations
-  **dbVar:** Genomic structural variation
-  **Gene:** gene-centered information
-  **SRA:** Sequence Read Archive
-  **BioSystems:** Pathways and systems of interacting molecules
-  **HomoloGene:** eukaryotic homology groups
-  **Probe:** sequence-specific reagents
-  **BioProject:** aggregated biological research project data

-  **dbGaP:** genotype and phenotype
-  **UniGene:** gene-oriented clusters of transcript sequences
-  **CDD:** conserved protein domain database
-  **Clone:** integrated data for clone resources
-  **UniSTS:** markers and mapping data
-  **PopSet:** population study data sets
-  **GEO Profiles:** expression and molecular abundance profiles
-  **GEO DataSets:** experimental sets of GEO data
-  **Epigenomics:** Epigenetic maps and data sets
-  **PubChem BioAssay:** bioactivity screens of chemical substances
-  **PubChem Compound:** unique small molecule chemical structures
-  **PubChem Substance:** deposited chemical substance records
-  **Protein Clusters:** a collection of related protein sequences
-  **OMIA:** online Mendelian Inheritance in Animals
-  **BioSample:** biological material descriptions



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

GenBank záznam

Phormidium autumnale JR3 16S ribosomal RNA gene and 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence

GenBank: JN230338.1

[FASTA](#) [Graphics](#) [PopSet](#)

[Go to:](#)

LOCUS JN230338 1680 bp DNA linear BCT 25-OCT-2012
DEFINITION Phormidium autumnale JR3 16S ribosomal RNA gene and 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence.
ACCESSION JN230338
VERSION JN230338.1 GI:371997151
KEYWORDS .
SOURCE Phormidium autumnale JR3 (Microcoleus vaginatus)
ORGANISM [Phormidium autumnale JR3](#)
Bacteria; Cyanobacteria; Oscillatoriothyracaceae; Oscillatoriales; Phormidium.
REFERENCE 1 (bases 1 to 1680)
AUTHORS Strunecky,O., Elster,J. and Komarek,J.
TITLE Molecular clock evidence for survival of Antarctic cyanobacteria (Oscillatoriales, Phormidium autumnale) from Paleozoic times
JOURNAL FEMS Microbiol. Ecol. 82 (2), 482-490 (2012)
PUBMED [22671691](#)
REFERENCE 2 (bases 1 to 1680)
AUTHORS Strunecky,O., Elster,J. and Komarek,J.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (09-JUL-2011) Institute of Botany, Academy of Science of the Czech Republic, Dukelska 135, Trebon, Czech Republic
FEATURES
source Location/Qualifiers
1..1680
/organism="Phormidium autumnale JR3"
/mol_type="genomic DNA"
/strain="JR3"
/db_xref="taxon:[1104556](#)"
/note="acronym: Microcoleus vaginatus"
misc_RNA <1..>1680
/note="contains 16S ribosomal RNA and 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer"
ORIGIN
1 gaaccocctt ttctgggaa gattgttg gaaagcaact gacggtacca gaggaatcag
61 catcggctaa ctccgtgcca gcagccgagg taagacggag gatgcaagcg ttatccggaa
121 tgattgggcy taaagcgtcc gcaggtggca gttcaagtct gctgtcaaag accggggcct
181 aacttcggaa aggcagtgga aactgaacag ctagagtatg gtaggggcag agggaattcc
241 tgggttagcg gtgaaatgcy tagagatcag gaagaacatc ggtggggaag gcgctctgct
301 ggaccataac tgacactcag ggacgaaagc tagggggagcy aatgggatta gataccocag

Change region shown

Customize view

Analyze this sequence

Run BLAST

Pick Primers

Highlight Sequence Features

Find in this Sequence

LinkOut to external resources

SILVA SSU Database

[SILVA]

Related information

Related Sequences

PopSet

PubMed

Taxonomy

Recent activity

[Turn Off](#) [Clear](#)

[Phormidium autumnale JR3 16S ribosomal RNA gene and 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence](#) Nucleotide

[microcoleus vaginatus 16s \(182\)](#) Nucleotide

[Uncultured Microcoleus sp. clone DM1-103 16S ribosomal RNA gene](#) Nucleotide

[microcoleus \(1257\)](#) Nucleotide

[Synechococcus elongatus PCC 6301 strain PCC 6301 16S ribosomal RNA gene](#) Nucleotide

[See more...](#)

BLAST

- Basic Local Alignment Search Tool
- V krátkém čase (heuristické vyhledávání) prohledá GenBank a najde nejpodobnější sekvence
- Využití – hledání ortologů sekvencí, hledání taxonomicky příbuzných sekvencí apod.

BLASTn programs search nucleotide databases using a nucleot

Enter Query Sequence

Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s) [Clear](#) Query subrange

Or, upload file [Procházejte](#)

Job Title
Enter a descriptive title for your BLAST search

Align two or more sequences

Choose Search Set

Database Human genomic + transcript Mouse genomic + transcript Others (nr etc.):
Nucleotide collection (nr/nt)

Organism Optional Exclude
Enter organism common name, binomial, or tax id. Only 20 top taxa will be shown.

Exclude Optional Models (XM/XP) Uncultured/environmental sample sequences

Entrez Query Optional
Enter an Entrez query to limit search

Program Selection

Optimize for Highly similar sequences (megablast)
 More dissimilar sequences (discontiguous megablast)
 Somewhat similar sequences (blastn)
Choose a BLAST algorithm

BLAST Search database Nucleotide collection (nr/nt) using Megablast (Optimize for highly similar sequences)
 Show results in a new window

Query ID [gi|371997151|gb|JN230338.1](#)
Description Phormidium autumnale JR3 16S ribosomal RNA gene and 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer,
partial sequence
Molecule type nucleic acid
Query Length 1680

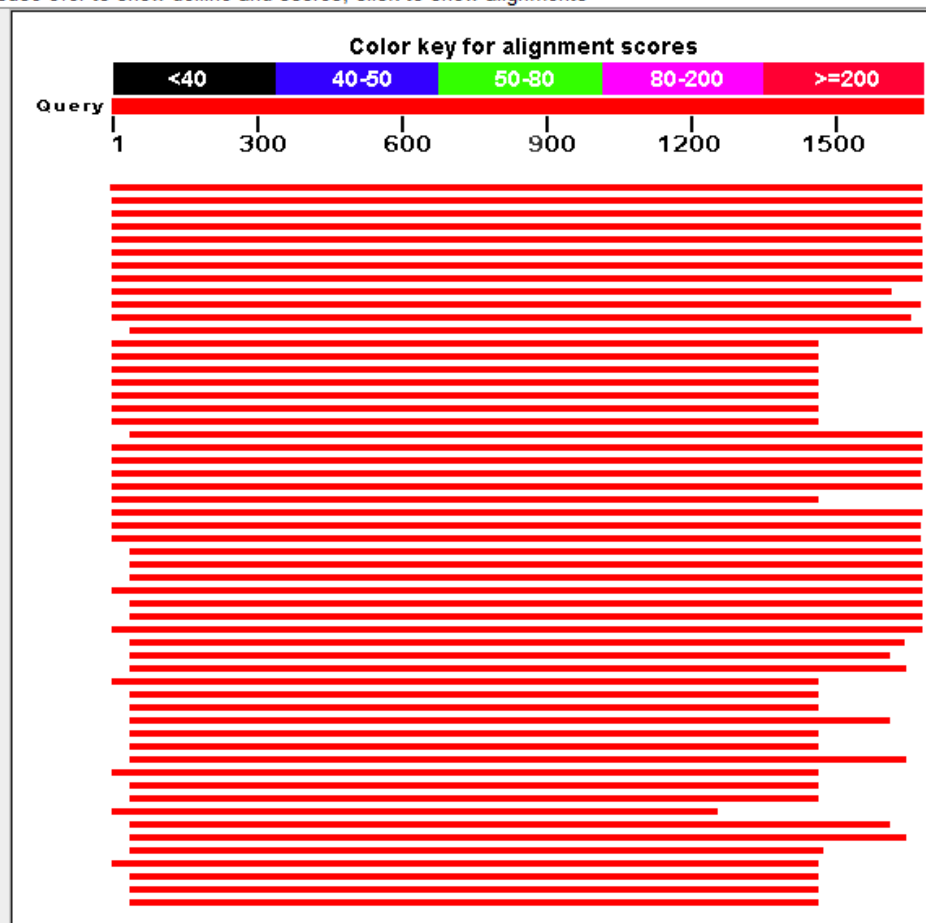
Database Name nr
Description Nucleotide collection (nt)
Program BLASTN 2.2.28+ [► Citation](#)

Other reports: [► Search Summary](#) [\[Taxonomy reports\]](#) [\[Distance tree of results\]](#)

Graphic Summary

Distribution of 101 Blast Hits on the Query Sequence

Mouse-over to show define and scores, click to show alignments



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Výsledek BLAST prohledávání

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident	Accession
Phormidium autumnale JR3 16S ribosomal RNA gene and 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	3103	3103	100%	0.0	100%	JN230338.1
Phormidium autumnale JR43 16S ribosomal RNA gene and 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence >qbJN230337.1 Phormidium autumnale JR4 16S ribosomal RNA gene and 16S-23S riboso	3068	3068	99%	0.0	99%	JN230336.1
Phormidium autumnale JR12 16S ribosomal RNA gene and 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	3068	3068	99%	0.0	99%	JN230335.1
Phormidium autumnale JR6 16S ribosomal RNA gene and 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	3035	3035	99%	0.0	99%	JN230339.1
Phormidium cf. autumnale CCALA 145 16S ribosomal RNA gene and 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	2778	2791	99%	0.0	97%	JN230340.1
Phormidium autumnale A25 16S ribosomal RNA gene and 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	2778	2778	99%	0.0	97%	JN230341.1
Microcoleus vaginatus SRS1-KK2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence, and 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, tRNA-Ile and tRNA-Ala genes, complete sequence	2713	2713	99%	0.0	96%	EF654078.1
Microcoleus vaginatus SNM1-KK1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence, and 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, tRNA-Ile and tRNA-Ala genes, complete sequence	2680	2680	99%	0.0	96%	EF654077.1
Microcoleus vaginatus CSU-U-KK1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence, and 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, complete sequence	2678	2678	95%	0.0	97%	EF667962.1
Phormidium autumnale CCALA 154 16S ribosomal RNA gene and 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	2669	2669	99%	0.0	96%	JN230342.1
Oscillatoria nigro-viridis PCC 7112, complete genome	2601	5202	98%	0.0	95%	CP003614.1
Uncultured cyanobacterium clone AN2_1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence, 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, complete sequence, and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence	2590	2590	97%	0.0	95%	FJ805910.1
Phormidium autumnale e18_1 16S ribosomal RNA gene and 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	2588	2588	86%	0.0	99%	JQ769136.1
Phormidium autumnale E17 16S ribosomal RNA gene and 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	2545	2545	86%	0.0	98%	JQ769135.1
Phormidium autumnale A25 16S ribosomal RNA gene and 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	2529	2529	86%	0.0	98%	JQ769131.1
Phormidium autumnale A10 16S ribosomal RNA gene and 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	2529	2529	86%	0.0	98%	JQ769129.1
Phormidium autumnale sv30 16S ribosomal RNA gene and 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	2523	2523	86%	0.0	98%	JQ769130.1
Phormidium autumnale A6 16S ribosomal RNA gene and 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	2499	2499	86%	0.0	97%	JQ769132.1
Phormidium autumnale sw11 16S ribosomal RNA gene and 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	2475	2475	86%	0.0	97%	JQ769134.1
Uncultured cyanobacterium clone AN2_2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence, 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, complete sequence, and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence	2453	2453	97%	0.0	94%	FJ805911.1
Phormidium autumnale JR16 16S ribosomal RNA gene and 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	2449	2449	99%	0.0	93%	JN230329.1
Phormidium autumnale JR7 16S ribosomal RNA gene and 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	2449	2449	99%	0.0	93%	JN230328.1
Phormidium autumnale JR1 16S ribosomal RNA gene and 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	2442	2442	99%	0.0	93%	JN230327.1
Phormidium autumnale JR29 16S ribosomal RNA gene and 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	2442	2442	99%	0.0	93%	JN230326.1
Phormidium autumnale sv25 16S ribosomal RNA gene and 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	2440	2440	86%	0.0	97%	JQ769133.1



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

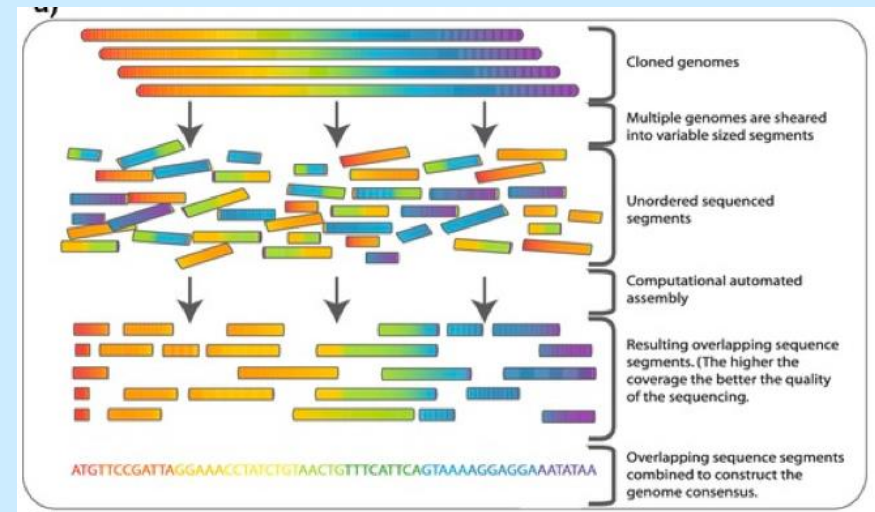
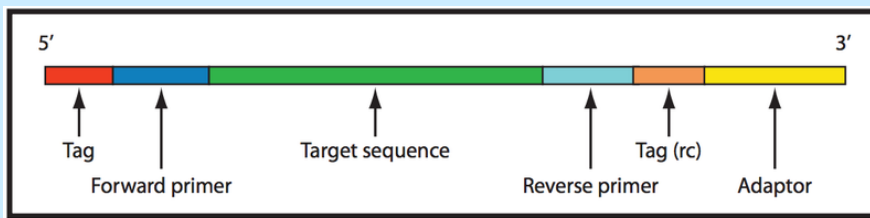


OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

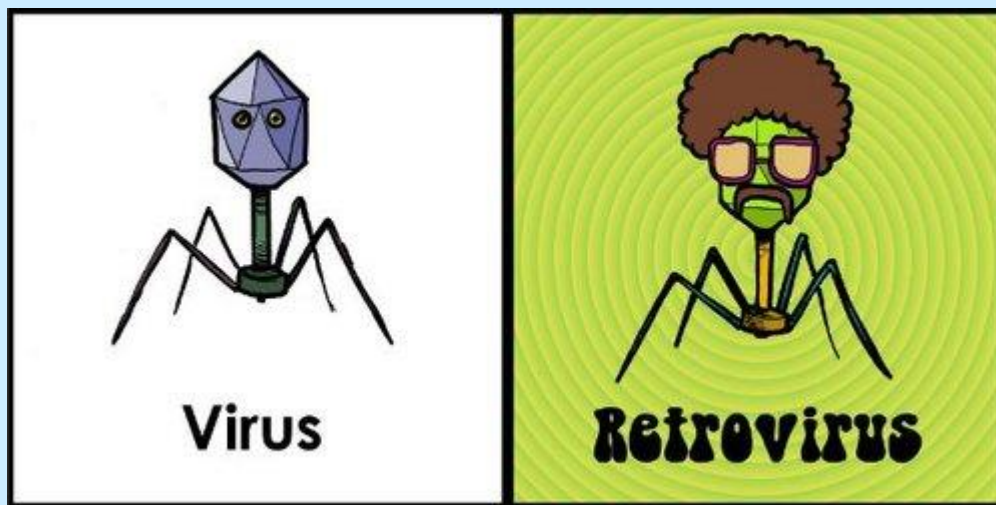
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Sequence-based analýza pomocí NGS

- Velké množství sekvencí – desetitisíce až milióny
- Kratší čtení 200 – 700
- 454 pyrosekvenování, Illumina
- Méně přesné
- Amplikonové sekvenování x shotgun sekvenování



Děkuji za pozornost!!!



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

- <https://www.youtube.com/watch?v=MIfDx417SDs> kloning
- <https://www.youtube.com/watch?v=nudG0r9zL2M> sanger
- <https://www.youtube.com/watch?v=rsJoG-AuINE> 454
- <https://www.youtube.com/watch?v=Zqr8zHU> Illumina