



www.esaunggul.ac.id

PENGANTAR BIOINFORMATIKA

IBT 431

By Seprianto S.Pi, M.Si

Pertemuan 7

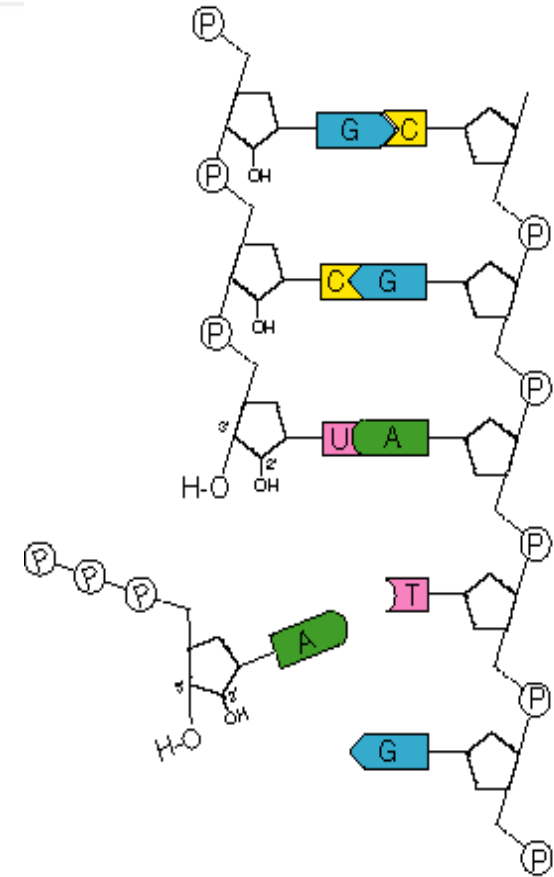
Teknik ContiQ Hasil Sekuens

Sasaran Perkuliahan

- Mampu melakukan Penggabungan Hasil Sekuen antara Sekuen Reverse dan Forward menggunakan Metode Bioedit, Metode DNASTAR dan MEGA

Pendahuluan

- Sekuensing (*DNA Sequencing*) merupakan metode yang digunakan untuk menentukan urutan nukleotida - arginin(A), sitosin(C), guanin(G), timin(T)- pada molekul DNA



Hasil sekuensing

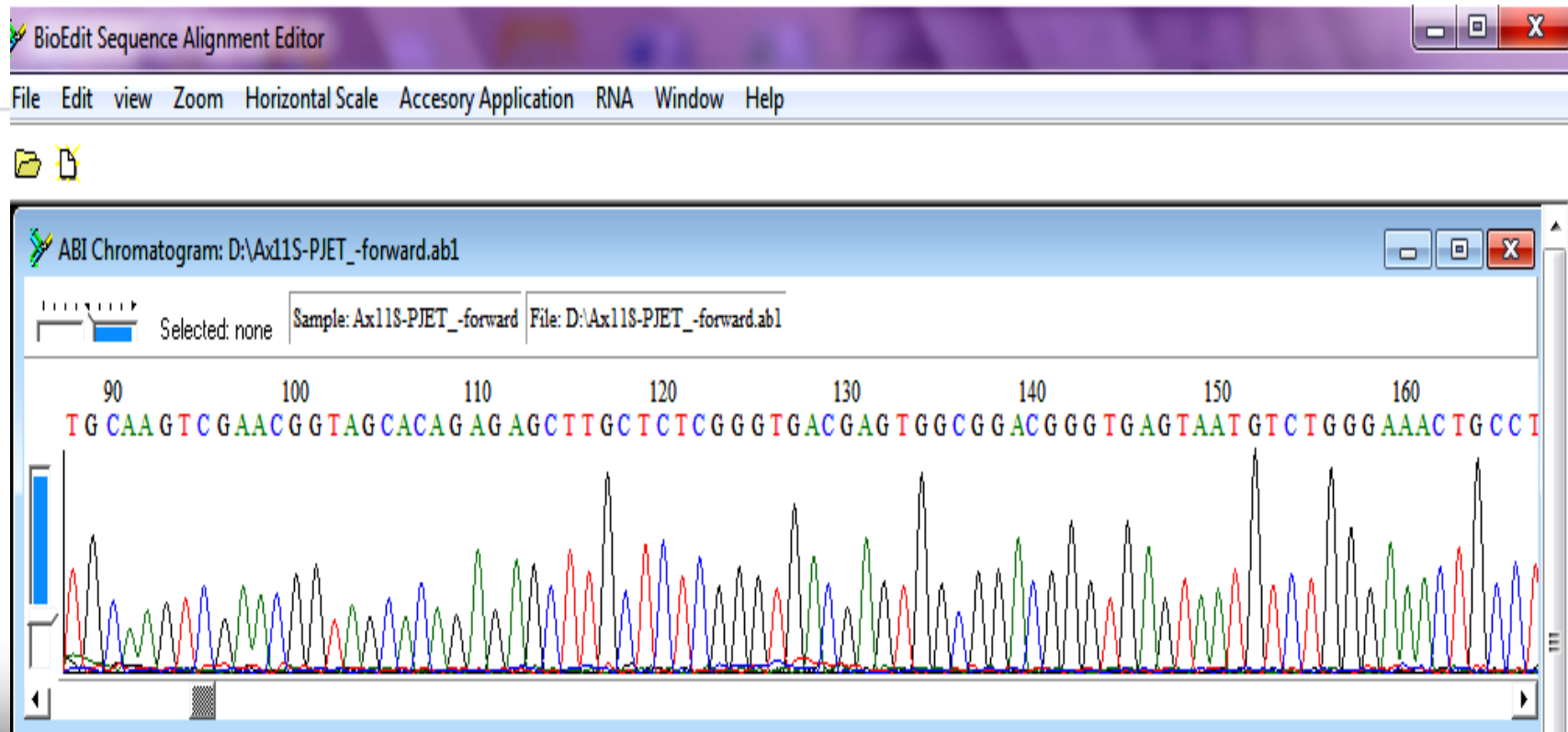
- Hasil sekuensing dalam bentuk file dengan ekstensi .ab1.
- file juga dapat berbentuk ekstensi .fas dan .pdf yang masing-masing berisi sekuen DNA hasil sekuensing dalam format FASTA dan grafik elektrogram
- Dalam analisis sekuensing, satu sampel akan menghasilkan 2 data sekuen secara terpisah dalam format Ab1, yaitu sekuen forward dan sekuen reverse

Software yang dapat digunakan dalam Kontiq Sekuens

- Bioedit
- DNASTar
- MEGA
- DNA Baser
- dll

Langkah Utama pemeriksaan visual terhadap hasil sekuensing

1. Buka file yang berektensi .ab1 dengan Bioedit



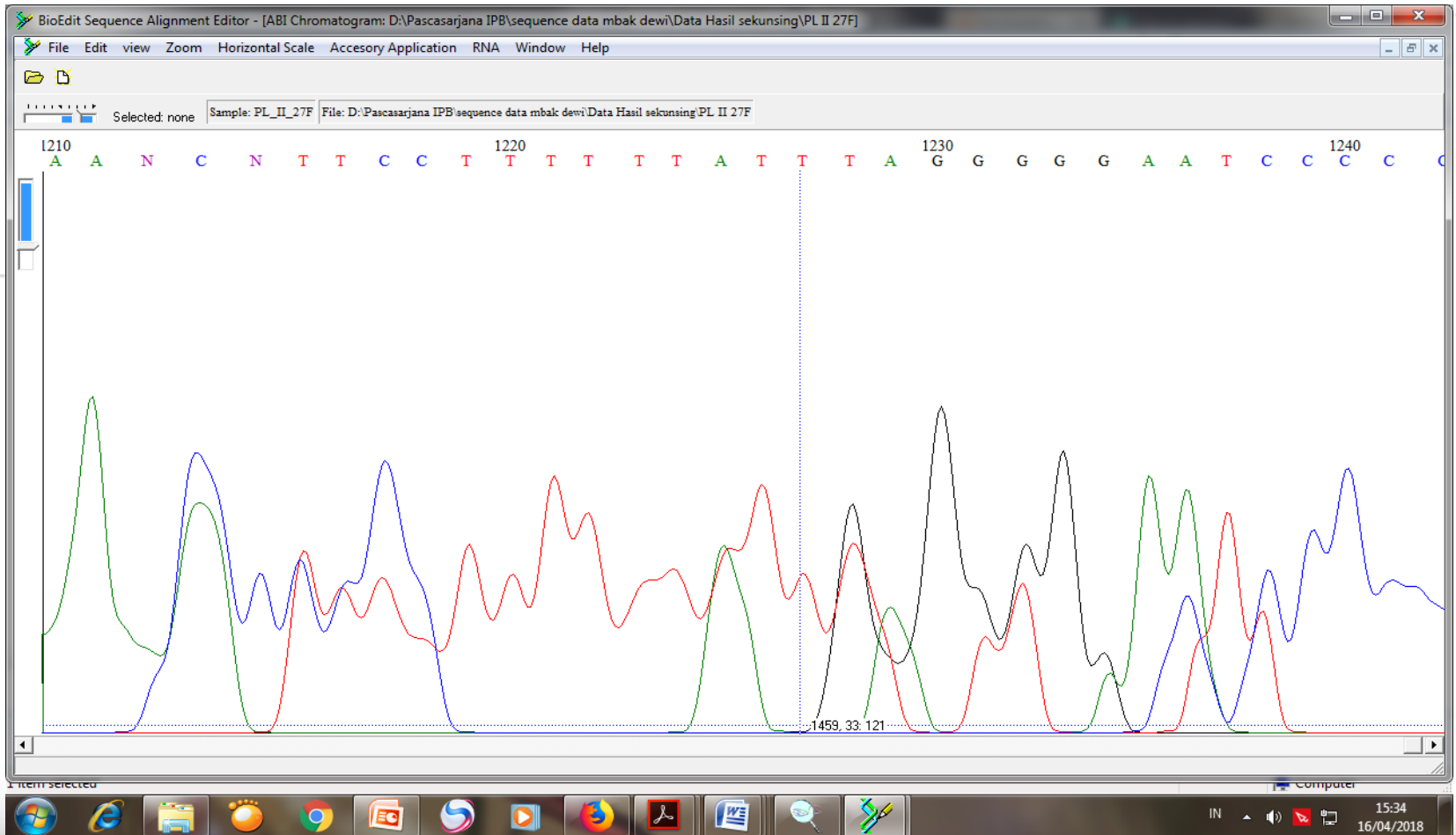
Langkah Utama pemeriksaan visual terhadap hasil sekuensing

Perhatikan grafik yang terdiri dari puncak dengan 4 warna berbeda.

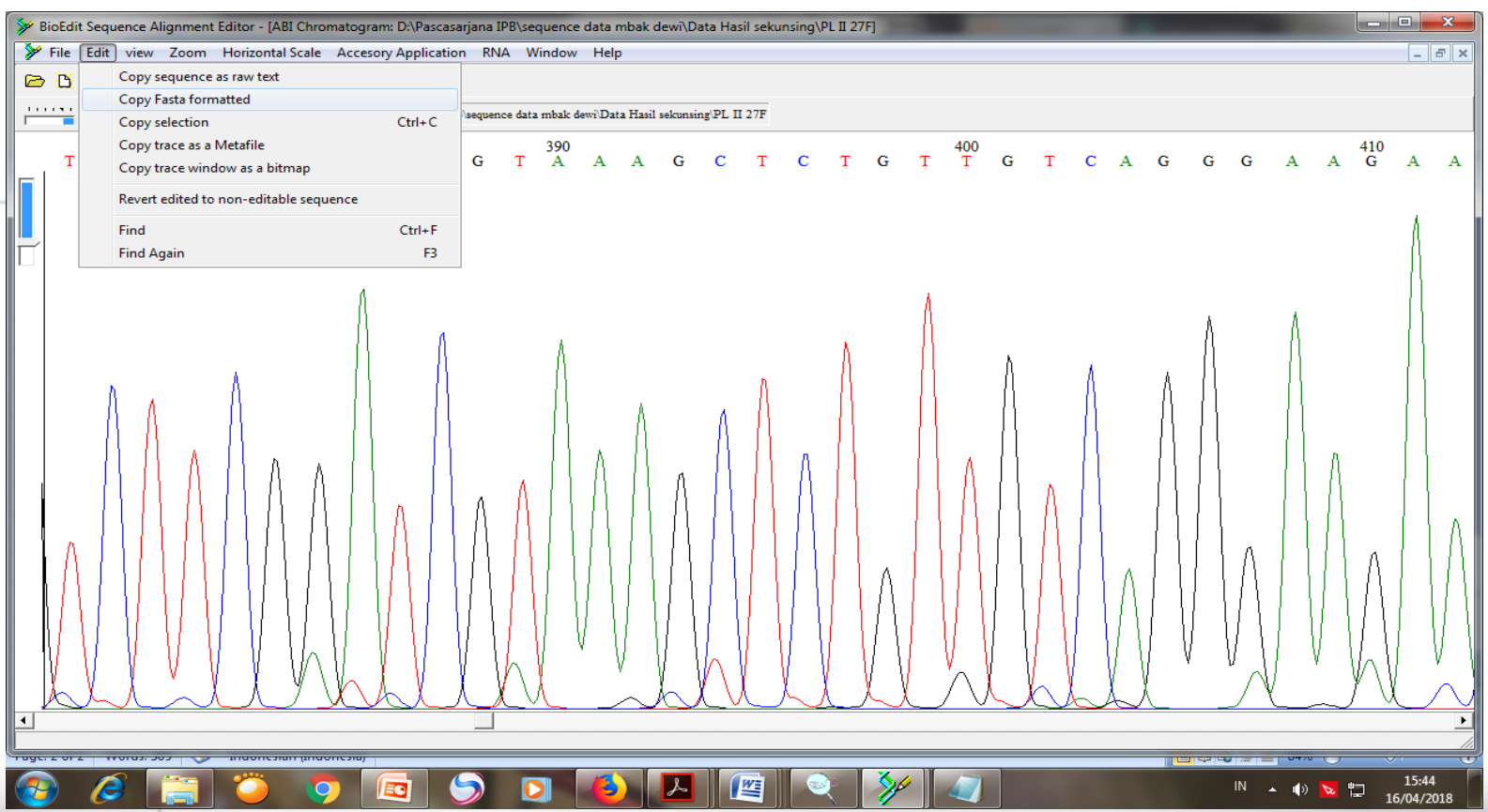
- Hasil sekuensing yang baik ditunjukkan oleh grafik yang puncaknya tinggi dan terpisah satu sama lain. Sedangkan hasil sekuensing yang jelek ditunjukkan oleh grafik yang puncaknya landai atau tidak terpisah satu sama lain. Periksa seluruh grafik dengan menggulung (*scroll*) sampai ujung

- Jika hasil sekuensing Anda baik, langkah selanjutnya adalah menyimpan hasil sekuensing tersebut ke dalam format FASTA untuk proses kerja selanjutnya. Namun, jika hasil sekuensing Anda tidak begitu baik (Gambar 2), ada dua pilihan yang dapat Anda lakukan: **sekuensing ulang** atau Anda dapat melakukan **analisis contig** dan membuang daerah yang bukan merupakan hasil konsensus dari kedua sekuen Anda
- Pemeriksaan hasil sequencing sebaiknya dilakukan dengan melihat seluruh grafik hingga selesai dan selanjutnya hasil sequencing disimoan dalam bentuk FASTA,

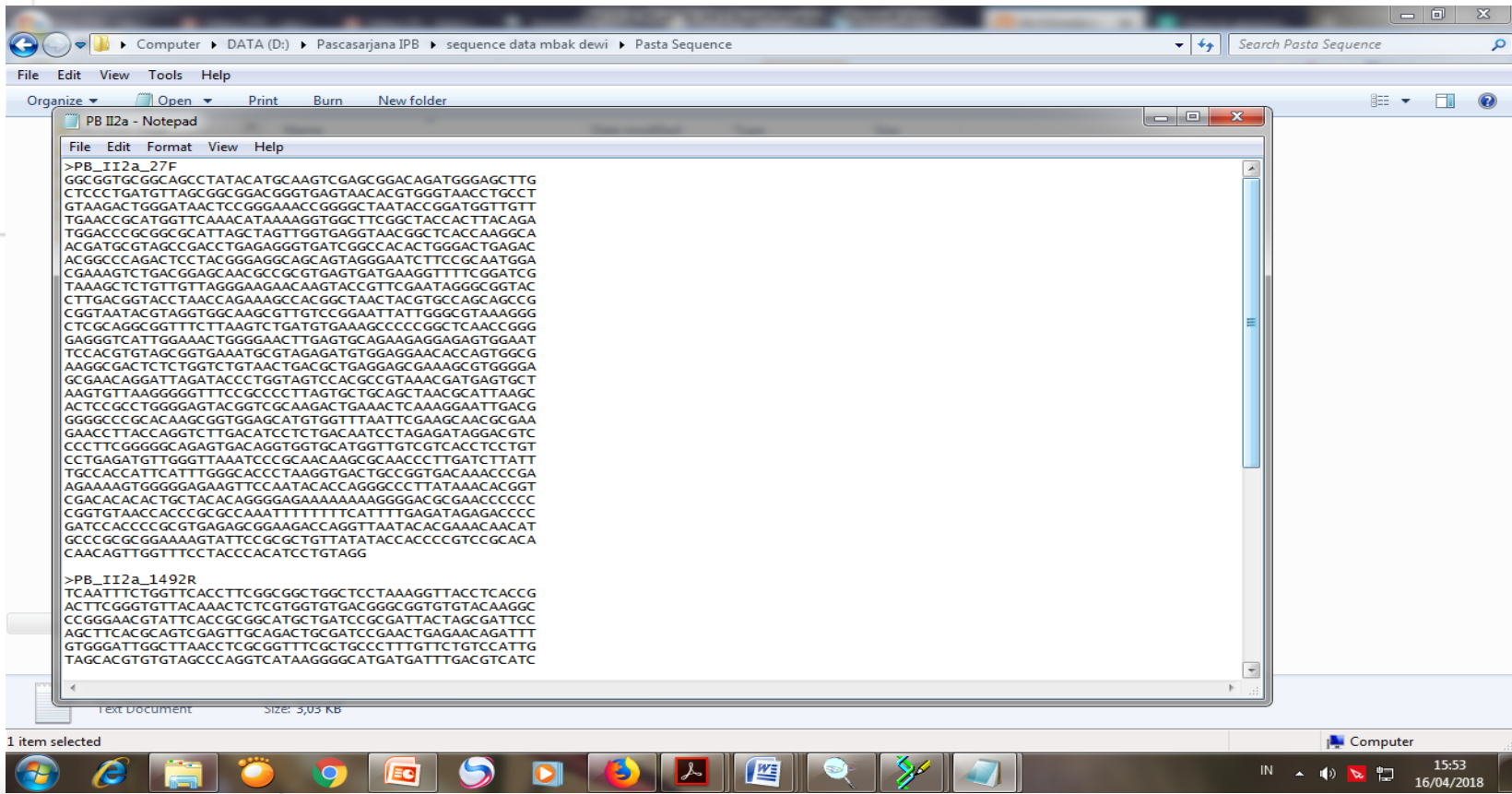
Hasil Visual yang tidak bagus dalam bentuk elektrogram



2. Untuk mendapatkan Fasta nukleotida maka **Edit/ klik Copy Fasta Format**, selanjutnya buka program notepad dan simpan Fasta pada program tersebut dengan klik **Paste**,



Penyimpanan Fasta dalam Notepad



Analisis Contiq Sekuens Forward dan Reverse

- Contig (berasal dari kata *contiguous*) dapat didefinisikan sebagai rekonstruksi dari serangkaian bagian DNA yang saling tumpang tindih
- Program komputer dapat digunakan untuk merakit kembali serangkaian bagian DNA tersebut ke dalam satu bentuk tunggal tanpa celah.
- Keterbatasan kemampuan mesin sekuensing menyebabkan tidak semua bagian DNA dapat diketahui urutan basanya (maksimal 1000 bp).

Analisis Contiq Sekuens Forward dan Reverse

- sekuensing dua arah dengan menggunakan primer dari vektor maupun primer spesifik.
- Sekuensing dua arah dapat meminimalisasi kemungkinan kesalahan dalam proses sekuensing. Kedua hasil sekuensing tersebut selanjutnya dapat digabungkan untuk mendapatkan sebuah gen utuh.

Langkah yang harus Anda lakukan:

1. Buka “New Alignment” pada program Bioedit

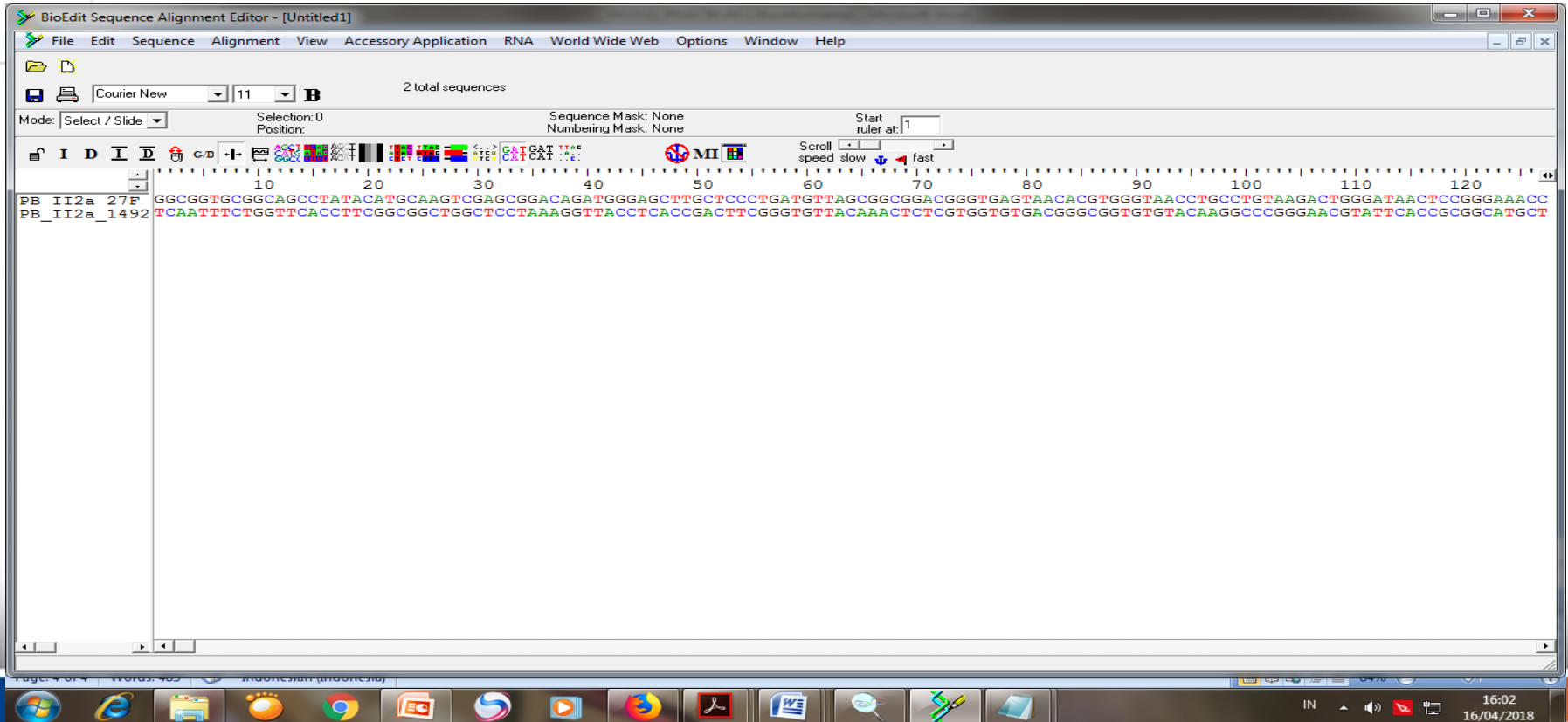
Klik menu: File | Import | Sequence alignment file. Pilih kedua file yang akan dianalisis contig (tekan dan tahan tombol Ctrl).

Selanjutnya Anda akan mendapatkan hasil seperti gambar di bawah ini

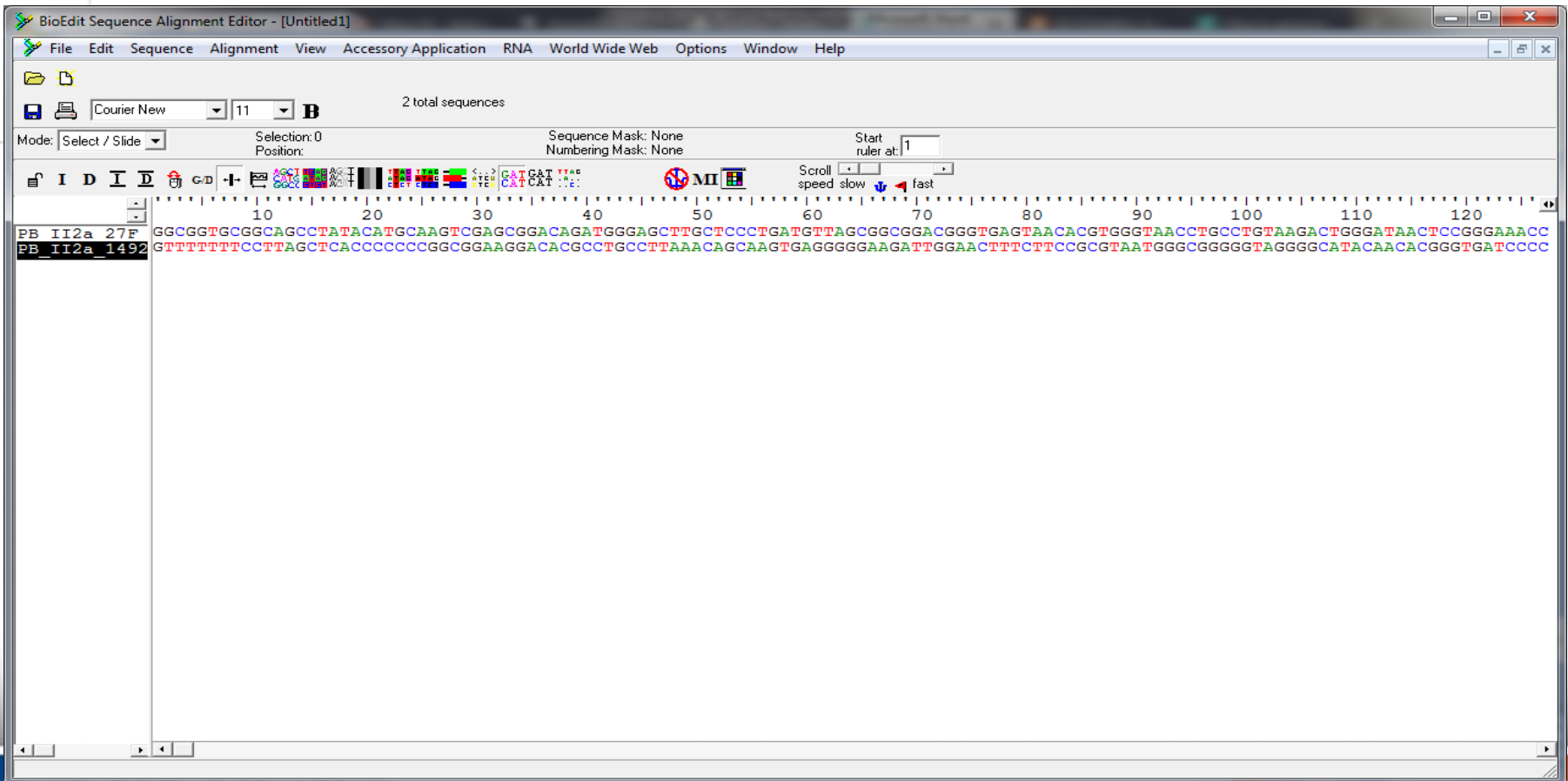
Simpan dengan nama baru dalam format FASTA. Sebaiknya dalam setiap proses pengeditan Anda harus menyimpan file dengan nama berbeda untuk menghindari hilangnya jejak data jika Anda salah mengedit

Langkah yang harus Anda lakukan:

1. Buka “New Alignment” pada program Bioedit
Klik menu: File | Import | Sequence alignment file. Pilih file yang akan dianalisis contig



2. Pilih salah satu sekuen dengan mengklik nama sekuen tersebut (Sekuen Reverse)
Lakukan “Reverse Complement” melalui menu : Sequence | Nucleic Acid | Reverse Complement



3. Sebelumnya blok kedua sequens (Forward dan Reverse)
Lakukan **“Pairwise Alignment”** melalui menu: **Sequence |
Pairwise alignment | Align two sequence (allow ends to slide)**

Hasil dari *pairwise alignment* adalah daerah yang saling tumpang tindih dari kedua sekuen tersebut. Dari hasil ini dapat diketahui apakah kedua sekuen tersebut dapat dicontig, dan dapat dihasilkan sekuen DNA utuh.

3. Sebelumnya blok kedua sequens (Forward dan Reverse) Lakukan **“Pairwise Alignment”** melalui menu: **Sequence | Pairwise alignment | Align two sequence (allow ends to slide)**

The screenshot displays the BioEdit Sequence Alignment Editor interface. The main window shows a pairwise alignment of two DNA sequences. The alignment score is 7862963, and the identities are 0,7868217. The sequences are PB_II2a_27F and PB_II2a_1492. The alignment is shown in a window titled "D:\BioEdit\Temp\~out.tmp" with 2 total sequences. The alignment is displayed as follows:

```
PB_II2a_27F      GGCGGTGCGGCA-----GCCT-ATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCC---T
PB_II2a_1492    GTTTTTTCCTTAGCTCACCCCGCGGGAAGGACACGCCTGCTTAAACA-GCAAGT-GAGGGGAAGATTGGAACCTTCTCCGGT
```

The alignment is shown in a window titled "D:\BioEdit\Temp\~out.tmp" with 2 total sequences. The alignment is displayed as follows:

Pairwise Alignment
Sequence 1: PB_II2a_27F
Sequence 2: PB_II2a_1492
Sequence ends allowed to slide over each other
Alignment score: 7862963
Identities: 0,7868217

Mode: Select / Slide
Selection: null
Position:
Sequence Mask: None
Numbering Mask: None
Start ruler at: 1
Scroll speed: slow / fast

4. Tampilkan sekuen konsensus dari hasil contig dengan menu : **Alignment | Create consensus sequence**

Hasil dari consensus sequence merupakan hasil dari penggabungan kedua hasil sekuensing dengan arah yang berbeda. Sekuen inilah yang digunakan untuk proses kerja lanjutannya blok kedua sequens (Forward dan Reverse)

4. Tampilkan sekuen konsensus dari hasil contig dengan menu : Alignment | Create consensus sequence



The screenshot displays the BioEdit Sequence Alignment Editor interface. The window title is "BioEdit Sequence Alignment Editor - [D:\BioEdit\Temp\~out.tmp]". The menu bar includes File, Edit, Sequence, Alignment, View, Accessory Application, RNA, World Wide Web, Options, Window, and Help. The status bar indicates "3 total sequences". The main window shows a multiple sequence alignment of three DNA sequences. The sequences are:

- PB II2a 27F
- PB II2a 1492
- Consensus

The alignment is shown from position 680 to 800. The consensus sequence is highlighted in black. The sequences are:

```
TGGAAACTGGGGAACTTGAGTG CAGAAAGAGGAGAGTGGAAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACGCGCTGAGGAG
TGGAAACTGGGGAACTTGAGTG CAGAAAGAGGAGAGTGGAAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACGCGCTGAGGAG
TGGAAACTGGGGAACTTGAGTG CAGAAAGAGGAGAGTGGAAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACGCGCTGAGGAG
```

5. Klik sekuen konsensus kemudian pilih menu : **Edit | Copy Sequences to Clipboard (fasta format)**

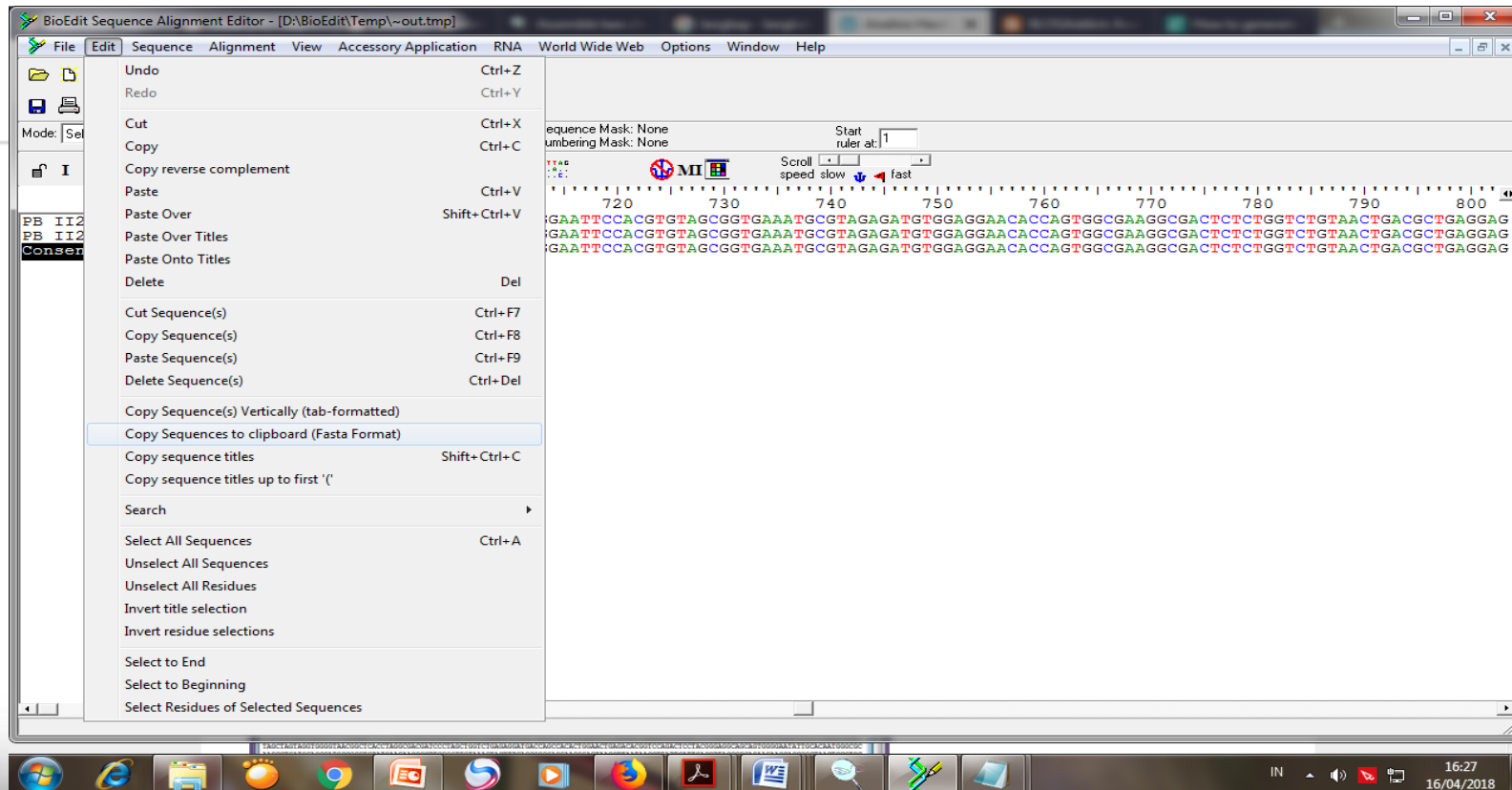
Buka file teks baru dari menu : **File | New text (Notepad) Paste sekuen konsensus**

agar memudahkan dalam analisis selanjutnya, sekuen dapat diubah menjadi format FASTA dengan menambahkan tanda “lebih besar dari” (>) diikuti dengan nama sekuen dan sekuen DNA pada baris kedua

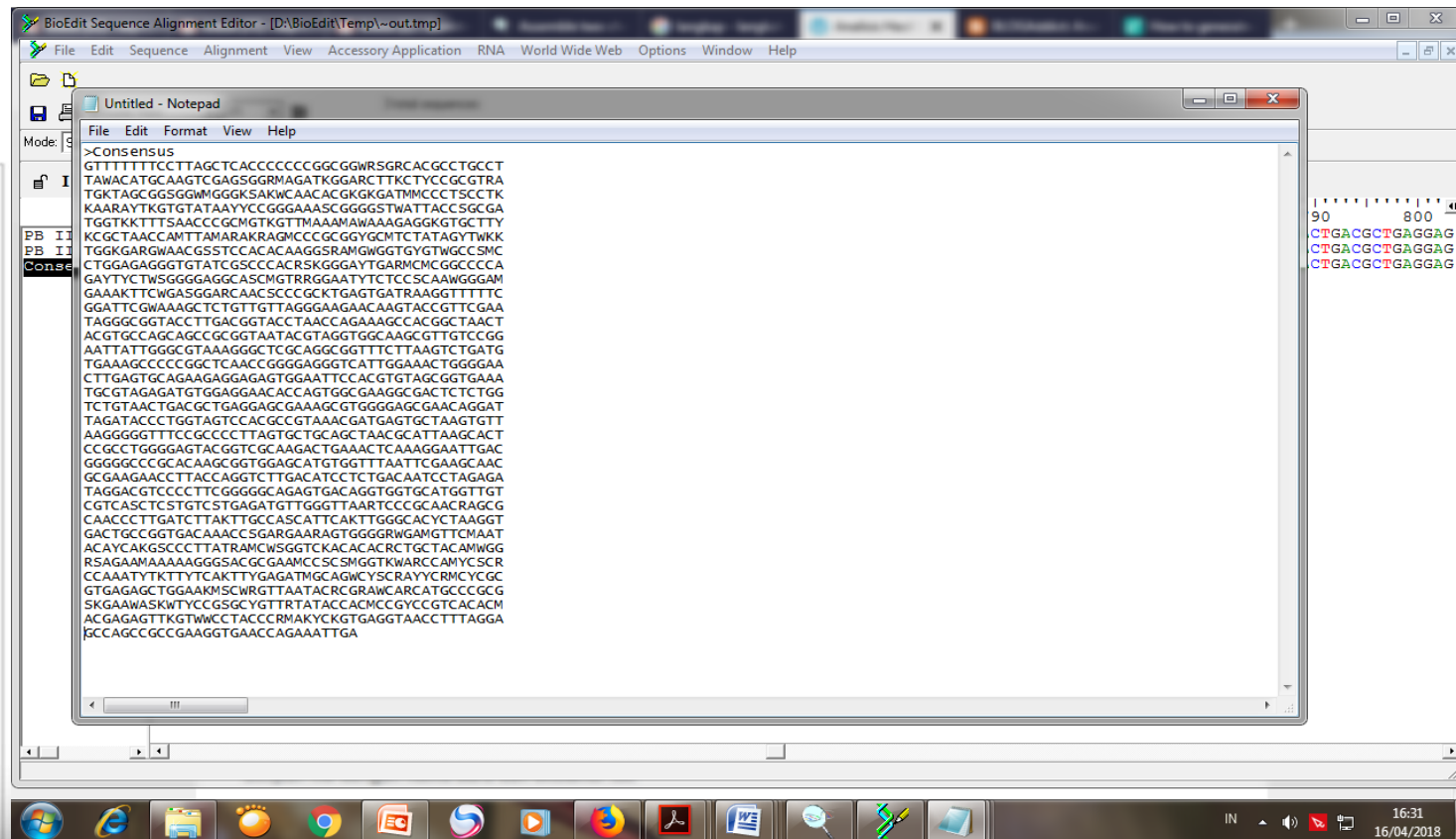
.

5. Klik sekuen konsensus kemudian pilih menu : **Edit | Copy Sequences to Clipboard (fasta format)**

Buka file teks baru dari menu : **File | New text (Notepad) Paste sekuen konsensus**



6. Simpan file dengan nama baru dan ekstensi .txt. (Notepad) (Gambar 10) dan Data hasil kontiq ini lah yang akan di analisis menggunakan **BLAST** untuk melihat homologi nya dengan DataBase yang ada di GENE BANK



TUGAS PRAKTIKUM ---- KUMPULKAN MINGGU DEPAN

1. Buatlah langkah langkah dalam mengkonting sekuen DNA untuk mendapatkan gen yang Utuh
2. Tentukanlah Gen tersebut dengan Teknik BLAST

THANK
YOU



607132.wordpress.com

Noviani's Blog

