

Smart, Creative and Entrepreneurial



www.esaunggul.ac.id

PENGANTAR BIOINFORMATIKA IBT 431



By Seprianto S.Pi, M.Si



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

a Unggul

- 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 sekuens 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

**	BioEdit Seq	uence Alignn	nent Editor						
F	ile Edit vi	ew Zoom	Horizontal Scale	Accesory Applicatio	n RNA Window He	elp			
Z	∋ <u>B</u>								
	🎾 ABI Chro	matogram: [):\Ax11S-PJETfor	ward.ab1					- • •
		Selected:	none Sample: Ax1	18-PJETforward File:	D:\Ax118-PJETforward.a	bl			
	90 T G CA	A G T C G	100 AACGGTAG	110 Cacagagagc	120 T T G C T C T C G G G	130 T G A C G A G T G G	140 C G G AC G G G T G A	150 .G TAAT G T C T G G	160 G AAAC T G C C T
		<u>~~</u>	MMM	MMMM					
	1								•



Langkah Utama pemeriksaan visual terhadap hasil sekuensing

Perhatikan grafik yang terdiri dari puncak dengan 4 warna berbeda.

 Hasil sekuensing yang baik ditunjukan oleh grafik yang puncaknya tinggi dan terpisah satu sama lain. Sedangkan hasil sekuensing yang jelek ditunjukan oleh grafik yang puncaknya landai atau tidak terpisah satu sama lain. Periksalah 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
- Pemerikasaan hasil sequencing sebaiknya dilakukan dengan melihat seluruh grafik hingga selesai dan selanjutnya hasil sequencing disimoan dalam bentuk FASTA,

Esa Unggul

Hasil Visual yang tidak bagus dalam bentuk elektrogram



Esa Unggul

 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

Esa Unggul

Computer > DATA (D:) > Pascasarjana IPB > sequence data mbak dewi > Pasta Sequence	✓ 4→ Search Pasta Sequence	
lit View Tools Help		
ze 👻 🦳 Open 👻 Print Burn New folder		-
PB II2a - Notepad		
File Edit Format View Help		
<pre>FID_LITAL_C: FID_LITAL_C</pre>		
Text Document Size: 3,03 KB		
ected	La Comp	uter
		1
	N 🔺 👍 📐 🖞	1

Ünggul

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

≽ BioEc	dit Sequence Ali	gnment Editor - [Untitle	d1]							
🎽 File	e Edit Sequei	nce Alignment View	Accessory Application	RNA World Wide Web O	ptions Window Help					- 8 ×
🛛 🗁 🖸	í									
. 🔒 🖉	Courier New	▼ 11▼ B	2 total sequences							
Mode: S	elect / Slide 💌	Selection: 0		Sequence Mask: None Numbering Mask: None	SI	art lor at 1				
0 7	<u>рт</u> р			AT GAT TIME						
			W201 2027 2023 - 5 2425 C	ATCAT : "#: 🔥	NII <u>Ha</u> speed slow	😈 ┥ fast				
DP TT			20 30		50 60 GCTCCCTGATGTTAGC		80 90 TAACACGTGGGTAACC	100 110 TGCCTGTAAGACTGGG	1	
PB_II	2a_1492 TC	AATTTCTGGTTCAC	CTTCGGCGGCTGGCTC	CTAAAGGTTACCTCACC	CGACTTCGGGTGTTACA	AACTCTCGTGGTGI	GACGGGCGGTGTGTAC	AAGGCCCGGGAACGTA	TTCACCGC	GCATGCT
										•
Tuge. + o	· · · · · · · · · · ·								~ _	~
			<u> </u>		- 人 / / / / 🧐 🛛 🔍			IN 🔺 🛛	» 🔽 📜	16:02



2.Pilih salah satu sekuen dengan mengklik nama sekuen tersebut (Sekuen Reverse)

Lakukan "Reverse Complement" melalui menu : Sequence | Nucleic Acid | Reverse Complement

BioEdit Sequence Alignment Editor - [Untitled1]	successive entrances when her a	
File Edit Sequence Alignment View Accessory Application RNA	World Wide Web Options Window Help	_ <i>8</i> ×
Co T		
2 total sequences		
Mode: Select / Slide Selection: 0 Position:	Sequence Mask: None Start Numbering Mask: None ruler at: 1	
	speed slow 🖞 🖣 (ast	
	40 50 60 70 80	90 100 110 120
PB II2a 27F GGCGGTGCGGCAGCCTATACATGCAAGTCGAGCG PB II2a 1492 GTTTTTTTCCTTAGCTCACCCCCCGGCGGAAGG	ACACGCCTGCCTTAAACAGCAAGTGAGGGGGAAGATTGGGACCGCGTGAGTAACA	GCGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACC GCGTAATGGGCGGGGGGTAGGGGCATACAACACGGGTGATCCCC
		16:09

16/04/2018



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)





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

BioEdit Sequence Alignment Editor - [D:\BioEdit\Temp\~out.tmp]	x
File Edit Sequence Alignment View Accessory Application RNA World Wide Web Options Window Help	- 8 ×
Courier New 🔽 11 🔽 B 3 total sequences	
Mode: Select / Slide Selection: null Sequence Mask: None Start Position: Numbering Mask: None nule: at 1	
	11110
EB II2a 27F TGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGGAGA	800 AGGAG
PB II2a 1492 TGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGGGGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACTGACGCGTGAAATGCGTGAGAATGCGTAGAGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACTGACGCGTGAAATGCGTGAAATGCGTAGAGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACTGACGCGTGAAATGCGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACTGACGCGTGAAATGCGTGAAATGCGTAGAGAACACCAGTGGCGAACGCGACTCTCTGGTCTGTAACTGACGCGTGAAATGCGTGAAATGCGTGAGAGTGGAACACCAGTGGCGAACTCCCGGCGACGCCGACTCTCTGGTCTGTAACTGACGCGTGAAATGCGTGAAATGCGGTGAAATGCGTAGAGGCGACCCCGGTGAAAGCGCGACCCCGGTGAAATGCGTGGAGGAACACCAGTGGCGAACGCCGACTCTCTGGTCTGTAACTGACGCGTGAACTGCGTGAAATGCGTGGAGGAACACCAGTGGCGAACGCCGACTCTCTGGTCGTGAACTGACGCGTGAAATGCGTGAAATGCGTGGGGAACACCAGTGGCGAACCCAGTGGCGAACTCCCTGGTCGTGACGCGTGAACTGCGTGAAATGCGTGGGGGAACACCCAGTGGCGAACGCGACTCTCTGGTCGTGAGAGGCGACTCTGGCGTGAACTGCGTGAAATGCGTGAAATGCGTGGGGAACACCCAGTGGCGAACGCCGACTCTCTGGTCGTGAACTGCGTGACGCGTGAAATGCGTGGGGGGAACACCCAGTGGCGAACGCCGACTCTCTGGTCGTGAACTGCGTGTGAACTGCGTGGAACTGCGTGGAACTGCGTGGAACTGCGTGGAACTGCGTGGGGGAACACCCAGTGGCGAACGCCGACTCTCTGGTCGTGAACTGCGCGTGGCGAACTGCGTGGAACTGCGTGGAACTGCGTGGCGAACTCCACGTGTGGCGAACTGCGTGGCGAACTGCGGGGGGGG	AGGAG
	Þ
	6:23
	4/2018



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

🗁 🔥	Undo	Ctrl+Z	
	Redo	Ctrl+Y	
Made: Cal	Cut	Ctrl+X	equence Mask: None Start
Mode. [Sel	Сору	Ctrl+C	umbering Mask: None ruler at: 1
l 🕛	Copy reverse complement		Stroll St
	Paste	Ctrl+V	
DB TT2	Paste Over	Shift+Ctrl+V	720 730 740 750 760 760 770 780 790 790 750 760 770 780 790 790
PB II2	Paste Over Titles		GAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAGCACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACTGACGCTG
Consen	Paste Onto Titles		IGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAGCACCCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTTGTAACTGACGCTG
	Delete	Del	
	Cut Sequence(s)	Ctrl+F7	
	Copy Sequence(s)	Ctrl+F8	
	Paste Sequence(s)	Ctrl+F9	
	Delete Sequence(s)	Ctrl+Del	
	Copy Sequence(s) Vertically (tab-formatted)		
	Copy Sequences to clipboard (Fasta Format)		
	Copy sequence titles	Shift+Ctrl+C	
	Copy sequence titles up to first '('		
	Search	•	
	Select All Sequences	Ctrl+A	
	Unselect All Sequences		
	Unselect All Residues		
	Invert title selection		
	Invert residue selections		
	Select to End		
	Select to Beginning		
·	Select Residues of Selected Sequences		
			-



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 GENEBANK





TUGAS PRAKTIKUM ---- KUMPULKAN MINGGU DEPAN

- Buat Lah langkah langkah dalam mengkontiq sekuen DNA untuk mendapatkan gen yang
 Utuh
- Tentukanlah Gen Tersebut dengan Teknik
 BLAST



