

# Sekwencjonowanie DNA

Metody klasyczne (pierwszej generacji)

# Cele sekwencjonowania

- Dostarczenie informacji o strukturze i funkcji genów
- Poznanie pełnej sekwencji DNA badanego organizmu (co umożliwia zrozumienie molekularnych mechanizmów funkcjonowania i ewolucji organizmu)
- Możliwość poszukiwania mutacji
- Poszukiwanie związku sekwencji DNA z cechami fenotypowymi

# Historia rozwoju metod sekwencjonowania

- 1953 - opracowanie modelu budowy DNA przez Jamesa Watsona i Francis Cricka
- 1972 - opracowanie sposobów izolacji materiału genetycznego (DNA) do dalszych badań. Rozwój technik rekombinacji (cięcie i łączenie fragmentów DNA) umożliwiających izolację dowolnych fragmentów DNA i ich replikację (w bakteriach)
- 1977 - Allan Maxam i Walter Gilbert ogłaszają publikację pt.: Sekwencjonowanie DNA przez chemiczną degradację. W tym samym czasie Sanger opublikował też metodę sekwencjonowania DNA przez syntezę katalizowaną enzymatycznie
- 1980 - Fred Sanger i Walter Gilbert otrzymali Nagrodę Nobla
- 1982 – utworzono Gen bank – publicznie dostępną bazę danych sekwencji DNA (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)
- 1984 - kompletna sekwencja wirusa Epstein-Barr, 170 kb
- 1997 - zsekwencjonowano 5Mb genom bakterii
- 2001 - 15 lutego - Konsorcjum HUGO opublikowało sekwencję genomu ludzkiego w Nature
- 2001 - 16 lutego - firma Celera Genomics opublikowała sekwencję genomu ludzkiego w Science
- 2005 – początek ery sekwencjonowania nowej generacji (NGS)
- 2005 – 2018 – dalszy rozwój technik NGS

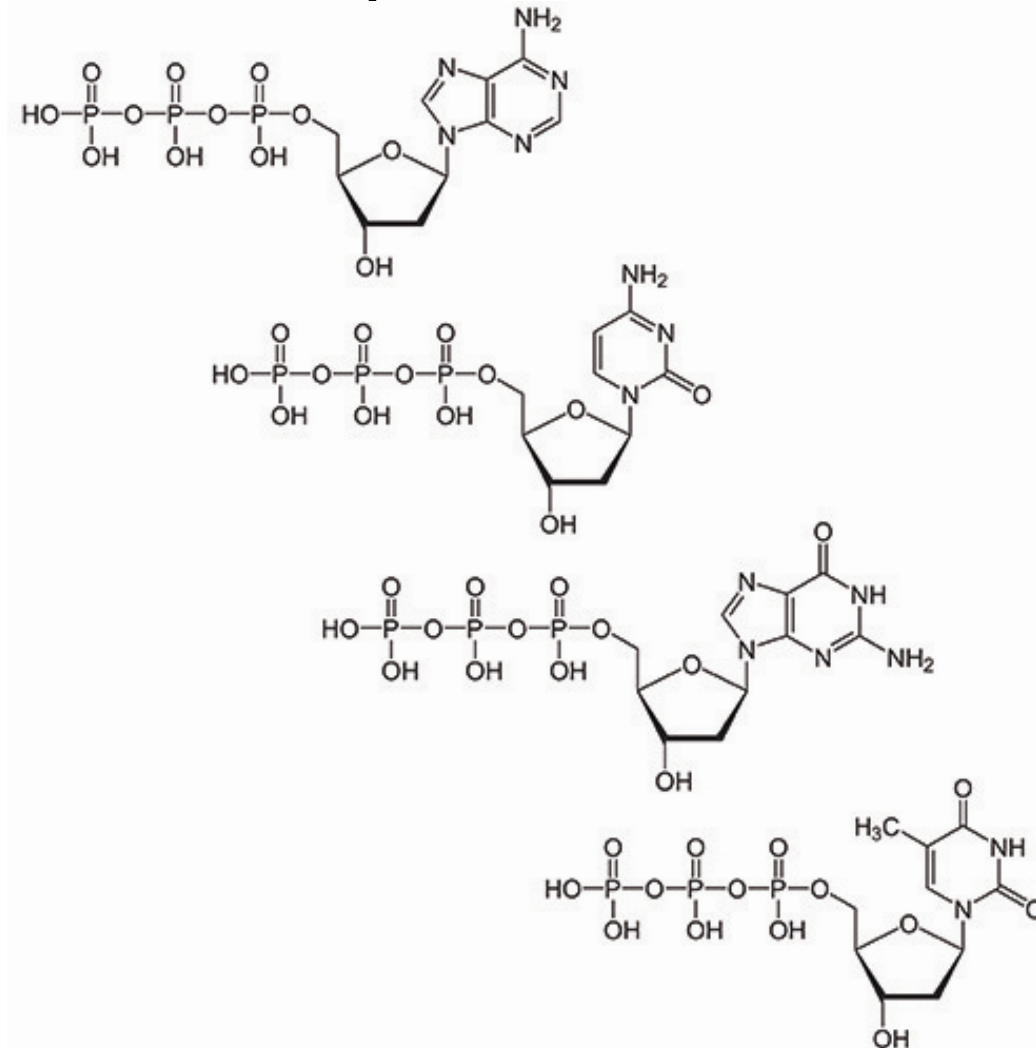
# Metoda Maxama-Gilberta Gilberta (1977)

- Polega na użyciu związków chemicznych do specyficznego rozczepienia DNA
- Przeprowadza się 4 niezależne reakcje, w których wykorzystuje się 4 różne odczynniki specyficzne dla poszczególnych zasad:
  1. reakcja „G” – DMS piperidyna
  2. reakcja „G+C” - kwas mrówkowy, piperidyna
  3. reakcja „T+C” – hydrazyna, piperidyna
  4. reakcja „C” – hydrazyna + NaCl, piperidyna

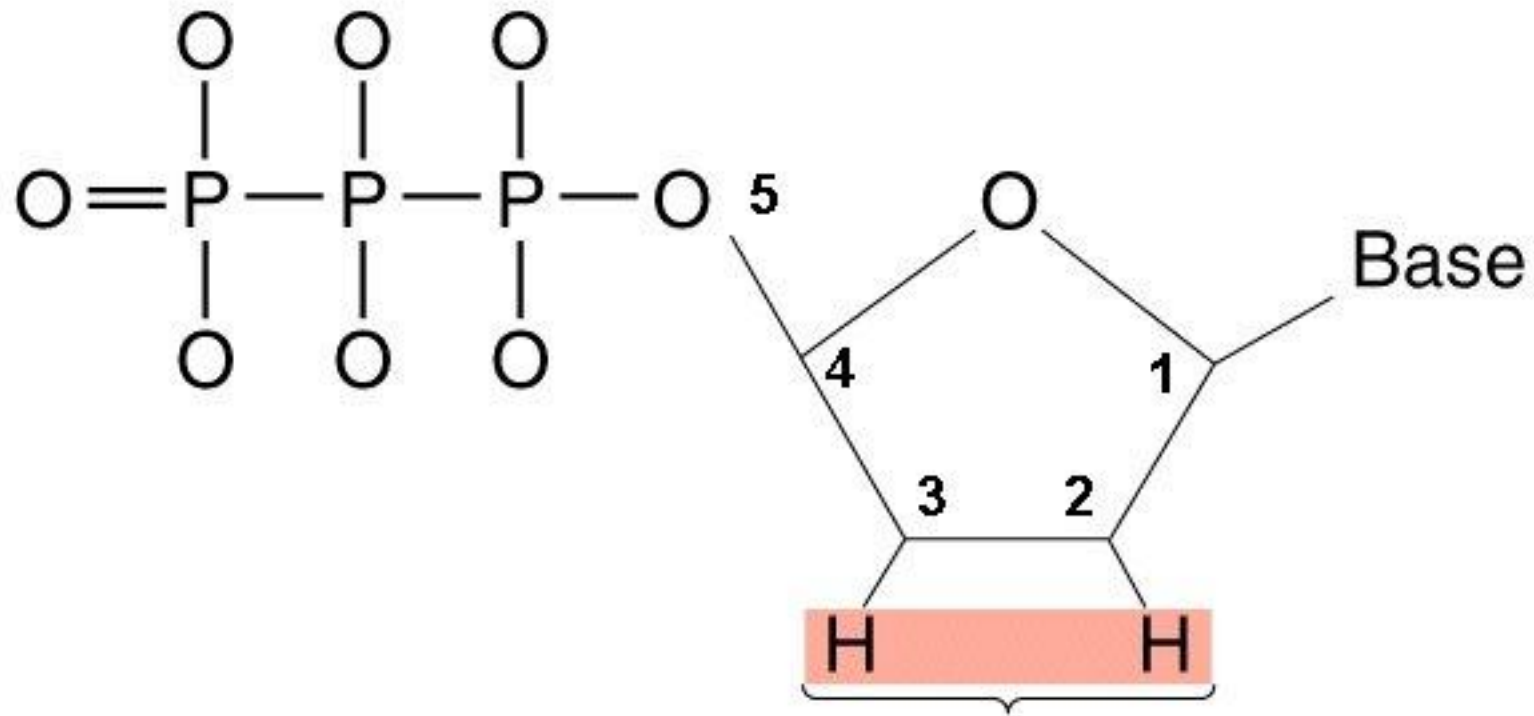
# Metoda Sangera

- Metoda terminacji wydłużania łańcucha (tzw. metoda dideoksy)
- Wykorzystuje polimerazę DNA, która ma zdolność do syntezy wiernej, komplementarnej kopii jednoniciowego DNA matrycowego oraz używa 2'3' dideoksynukleotydów jako substratów

# Budowa nukleotydu DNA (przypomnienie)

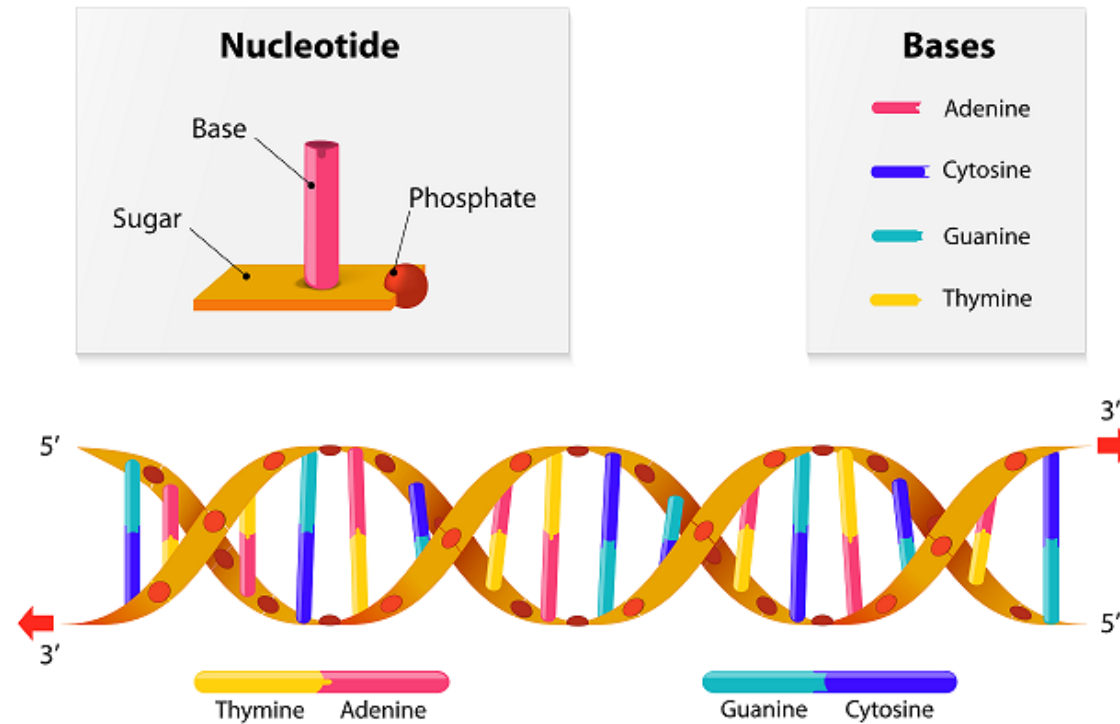


# Budowa dideoksy nukleotydu



# Budowa DNA przypomnienie

## DNA structure





# PCR – przypomnienie

- Reakcja replikacji DNA w warunkach in vitro
- Dobudowywanie nukleotydów nowej nici do startera katalizowane przez enzym – polimerazę DNA
- Matryca – jednoniciowe DNA (ssDNA)
- Do reakcji wymagane jest:
  - Odpowiednie środowisko reakcji (pH, stężenie jonów)
  - dNTP – nukleotydy DNA, muszą posiadać grupę OH przy węglu 3'
  - Startery
  - Matryca
  - Polimeraza DNA

# Polimeraza

- Enzymy używane w sekwencjonowaniu powinny charakteryzować się:
  - wysoką procesywnością
  - brakiem aktywności egzonukleazy 5' → 3'
  - brakiem aktywności egzonukleazy 3' → 5'

# Polimeraza

- Enzymem wykorzystywanym do reakcji wydłużania startera początkowo był fragment polimerazy DNA tz. fragment Klenowa (brak aktywności egzonukleolitycznej 5' → 3')
- Fragment Klenowa polimerazy z E.coli zastąpiono naturalną lub modyfikowaną polimerazą DNA z faga T7
- Wprowadzenie dideoksynukleotydów jest mniej zakłócone przez lokalne sekwencje nukleotydów, prążki o wyrównanej intensywności

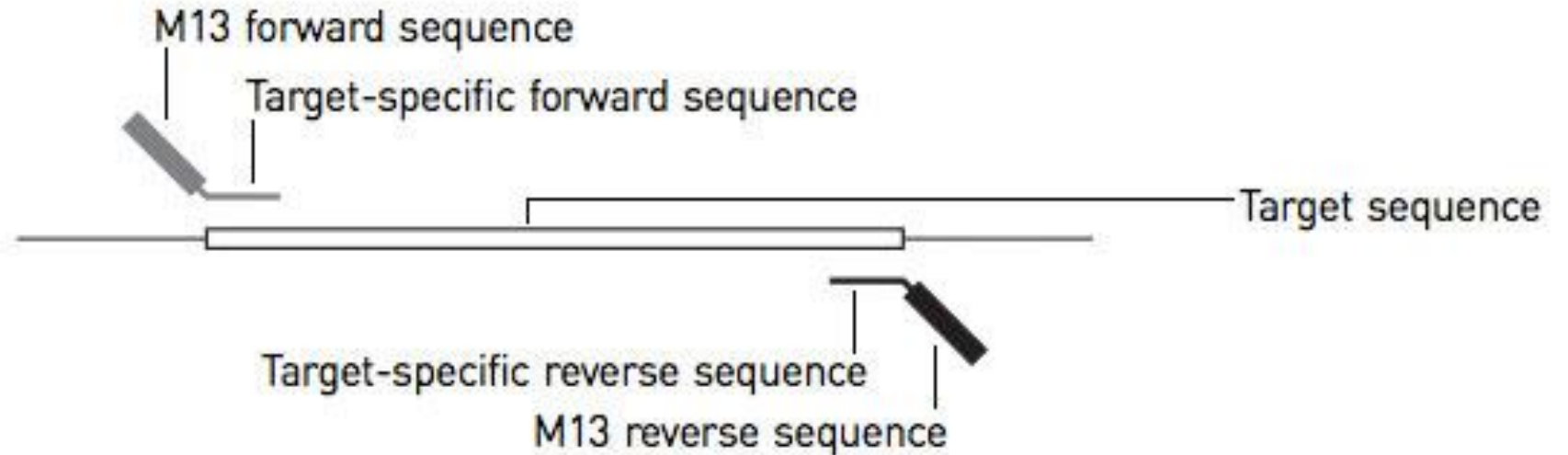
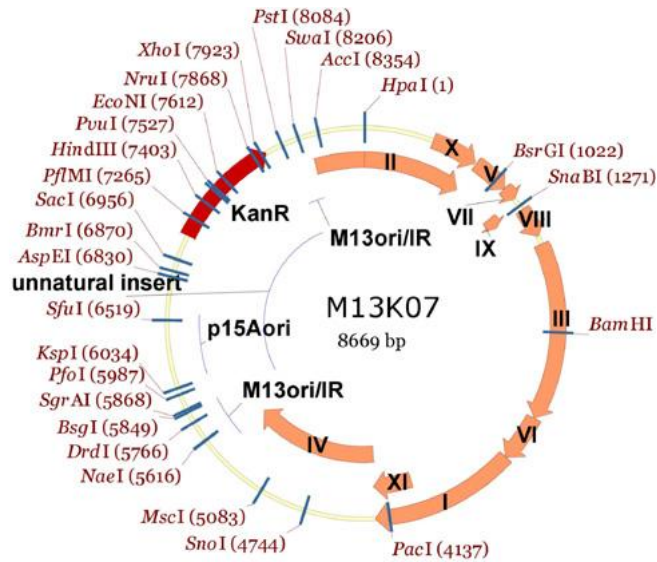
# Polimeraza

- Zastosowanie polimerazy z termofilnej bakterii *Thermus aquaticus* (Taq DNA polimeraza) pozwala na prowadzenie reakcji terminacji łańcucha w temperaturze 65 -70 °C, co minimalizuje artefakty spowodowane II -go rzędową strukturą DNA
- Tabor i Richardson w 1995r zamienili resztę fenyoalaniny Taq DNA polimerazy na resztę tyrozyny (termostabilny enzym sekwencyjny nie rozróżnia dideoksynukleotydów od deoksynukleotydów)

# Matryca

- DNA sklonowany na wektorze plazmidowym
- DNA sklonowany sklonowany na wektorze wektorze M13
- DNA sklonowany na fagmidzie
- Zastosowanie PCR do otrzymania j g ednoniciowego DNA

# Matryca – wektor plazmidowy



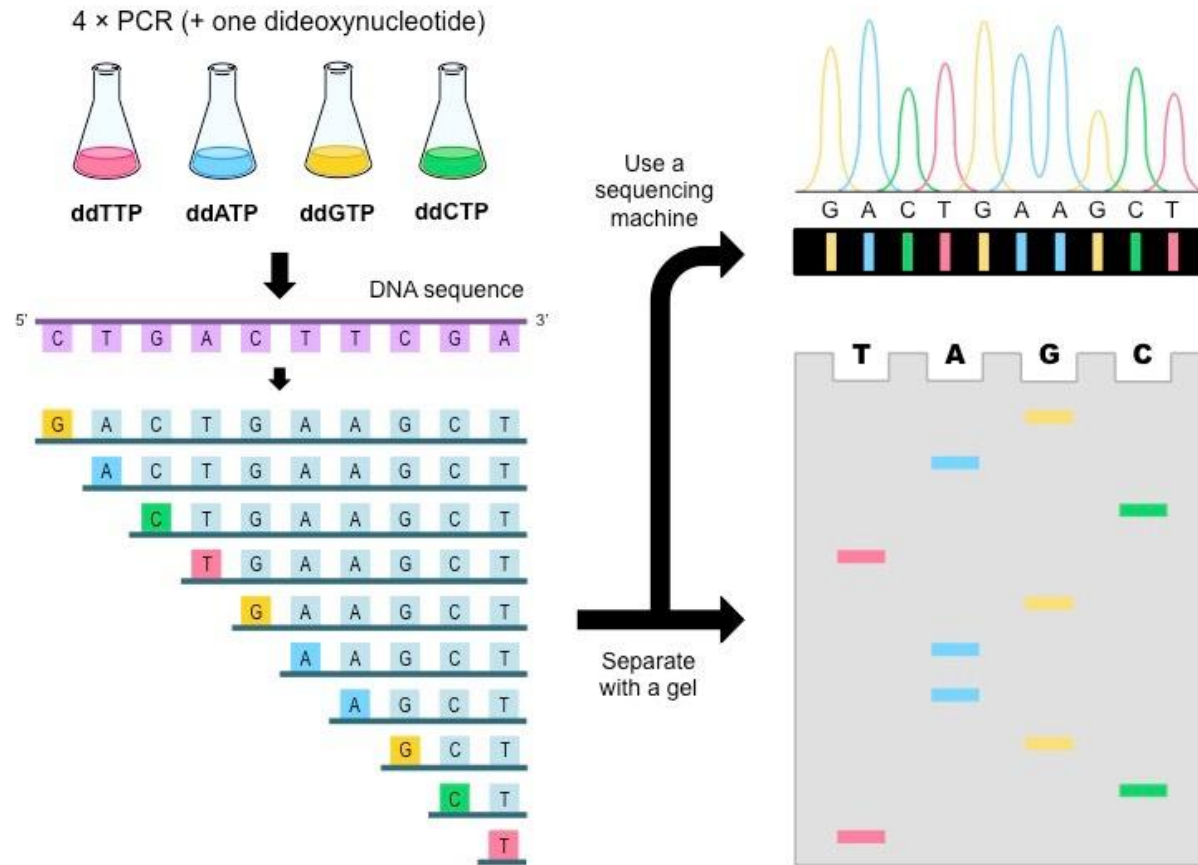
<http://www.elec-intro.com/cms/plus/view.php?aid=12974>

<http://www.onlinebiology.com/sangers-method-gene-sequencing/>

# Detekcja

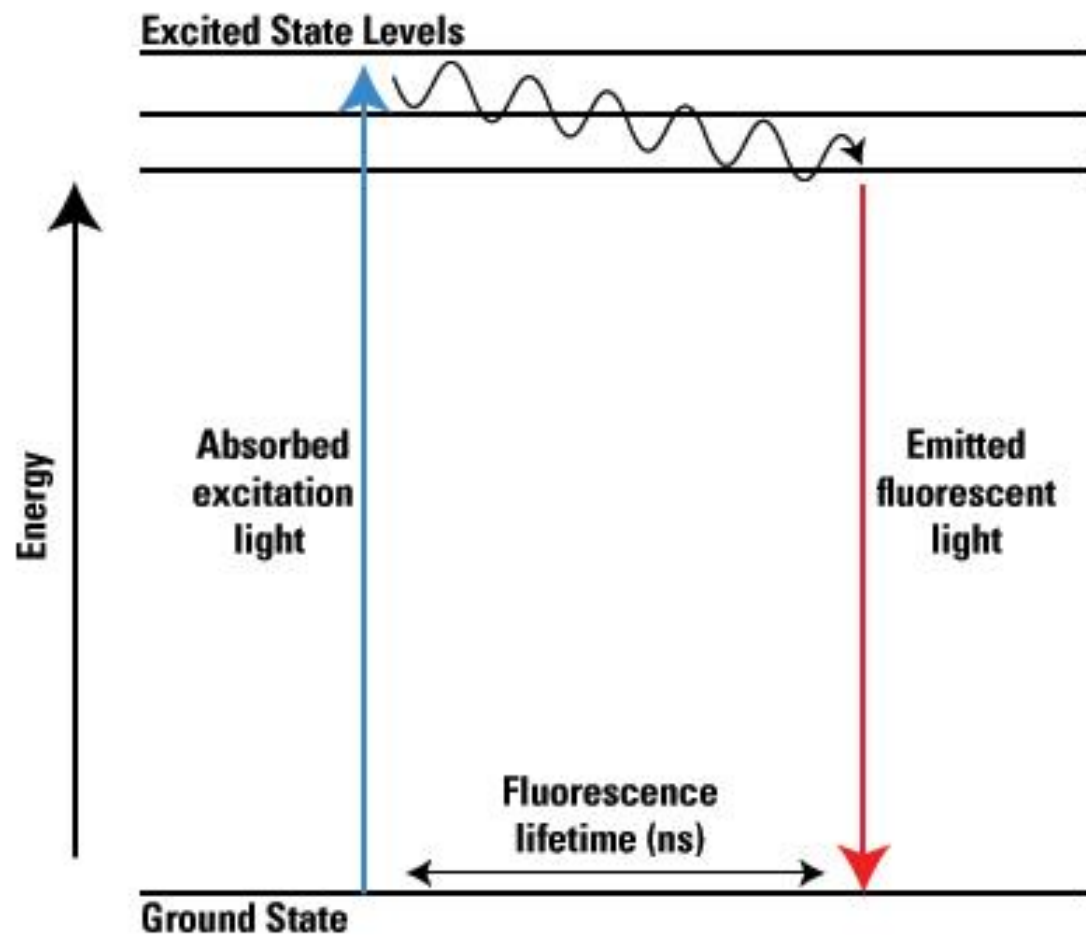
- Elektroforeza na żelu poliakrylamidowym (znakowanie radioaktywne, znakowanie fluorochromami, wybarwianie barwnikiem interkalującym np. bromek etydyny)
- Elektroforeza kapilarna (znakowanie fluorochromami)

# Sekwencjonowanie Sanger – schemat wersja klasyczna





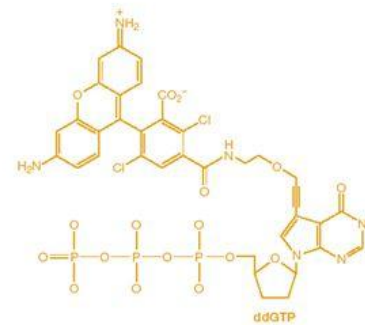
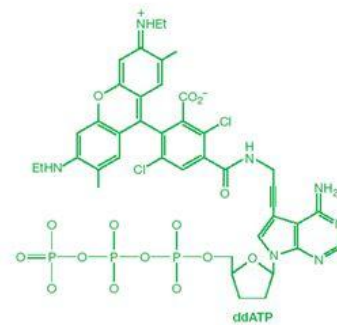
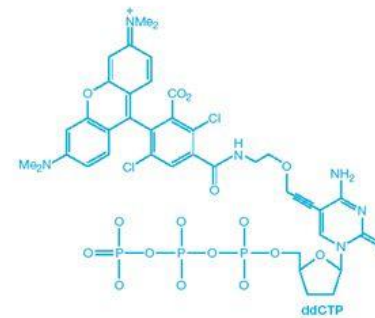
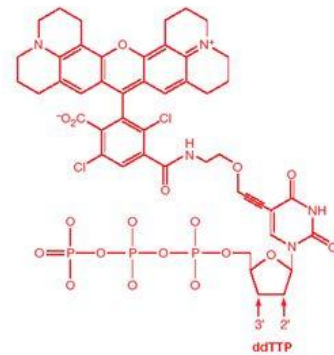
# Fluorescencja – zasada działania



# Sekwencjonowanie - barwniki

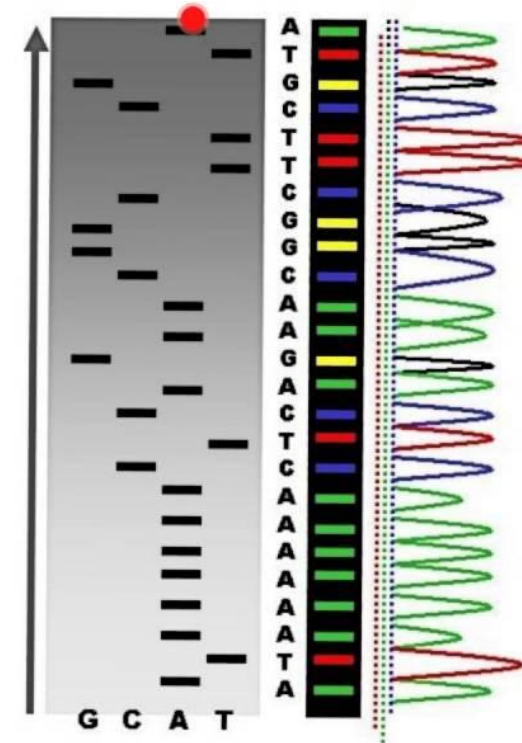
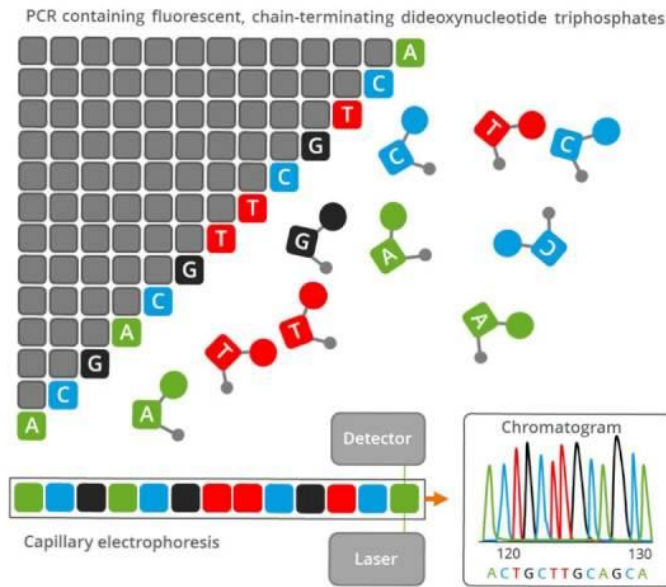
## Fluorescent Sanger Sequencing: “Dye-terminators”

Each of the 4 ddNTPs is labeled with a different fluorescent dye (instead of radioactivity)



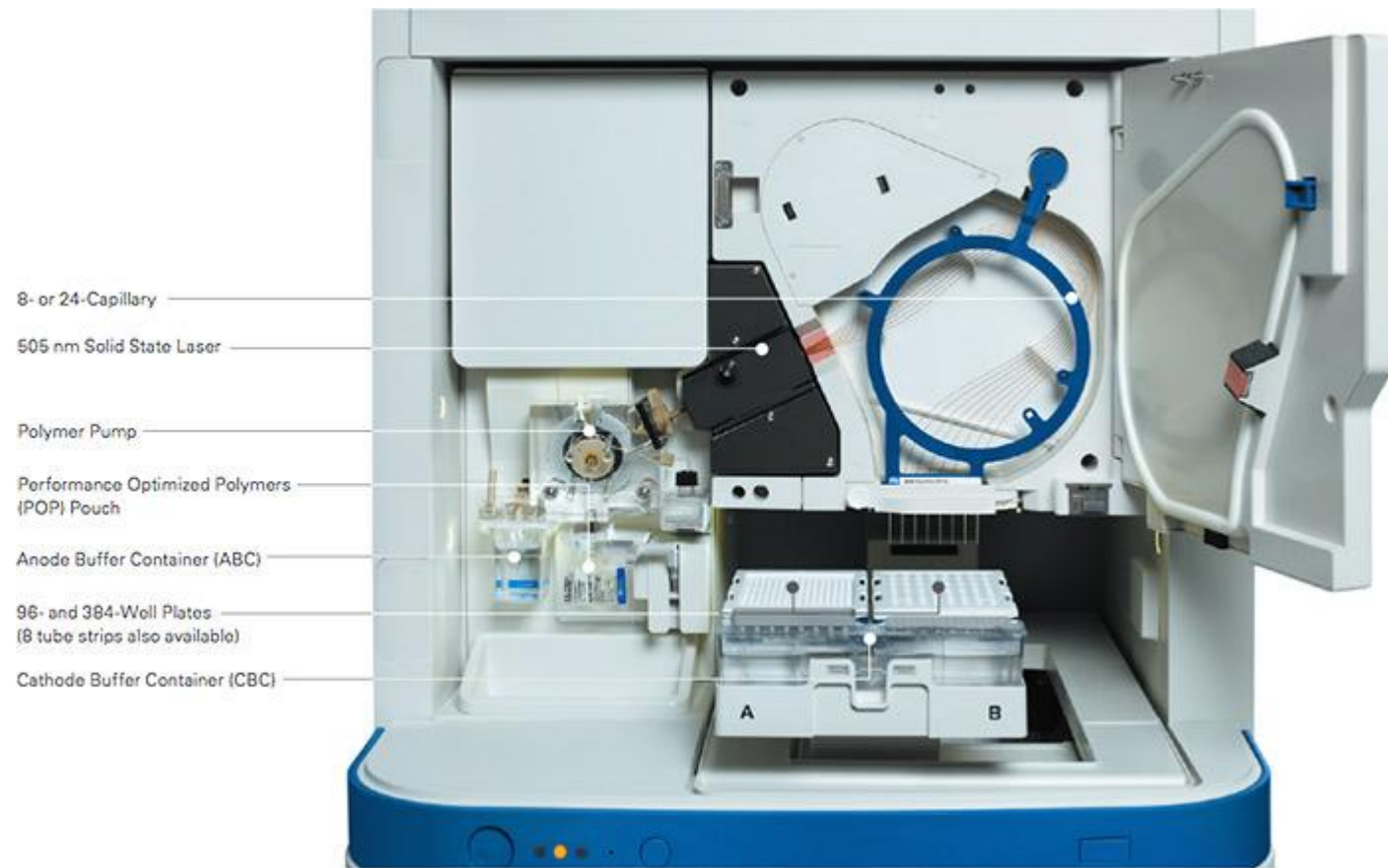
# Sekwencjonowanie Sangera – schemat wersja współczesna

## Sanger Sequencing



Sanger sequencing uses ddNTPs (dideoxynucleotide triphosphates) which do not have a free 3' OH mixed in with dNTPs. Whenever the DNA polymerase incorporates a ddNTP it won't be able to add any other nucleotides. Then gel electrophoresis is used to separate the DNA.

# Sekwenatory



# Elektroforogram – wynik sekwencjonowania

