

Sekvencování DNA

Co je sekvencování DNA?

- Určování primárního pořadí bází v řetězci DNA
- Analýza genomu
- Odvození sekvencí aminokyselin

Metody sekvencování

- Maxam-Gilbertova metoda – chemická
- Sangerova metoda – enzymatická
- Další metody – pyrosekvencování, minisekvencování, hydrogensířičitanové genomové sekvencování, sekvencování pomocí hybridizace

Společné rysy obou metod:

- Příprava a separace fragmentů DNA, jejichž velikost se liší o 1 nukleotid
- DNA s přesně definovanými konci (s místem pro vazbu primeru pro sekvencování)
- Příprava souboru všech fragmentů ssDNA lišících se svou délkou o jeden nukleotid
- Přesné elektroforetické rozdělení těchto fragmentů na základě jejich délky
- Objeveny přibližně ve stejnou dobu

Chemická (Maxam-Gilbertova) metoda

- Označení řetězců na 5' konci (radioaktivně nebo fluorescenčně)
- Separace řetězců DNA na ssDNA
- Rozdělení vzorku jednoho řetězce na 4 díly
- Na každý díl se působí chemickým činidlem, které selektivně modifikuje jeden nebo dva typy bází; koncentrace činidel taková, aby došlo k modifikaci jen v malé části bází

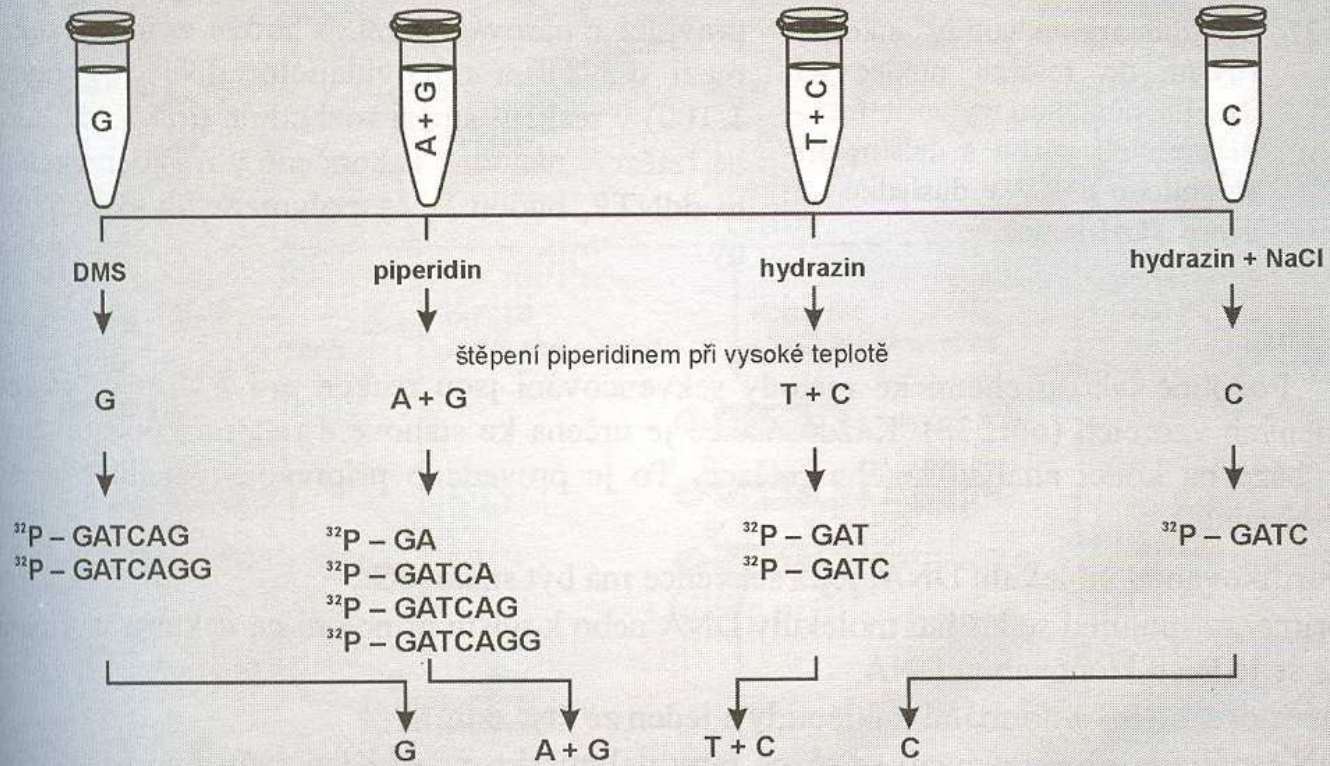
- Následné působení činidel vede k odstranění modifikovaných bází a k vytvoření zlomu řetězce
- Separace vytvořených fragmentů elektroforézou, autoradiografie a odečtení sekvence

5' GATCAGG 3'
3' CTAGTCC 5' dvouřetězcová DNA

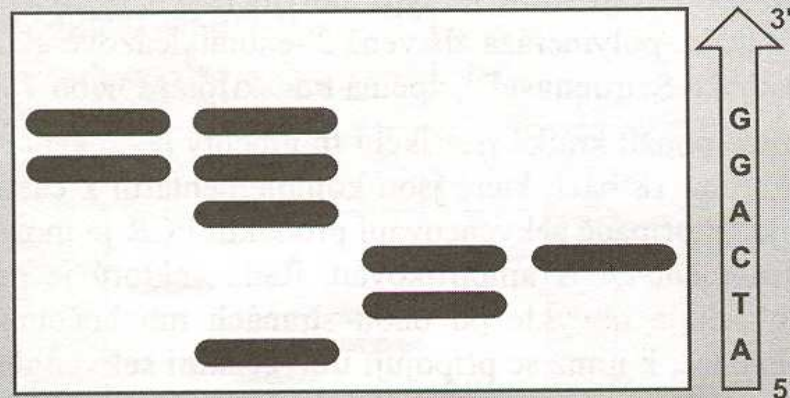
↓ koncové značení a separace řetězců

^{32}P - GATCAGG - 3'

↓
4 reakce modifikace bází



elektroforéza,
autoradiografie



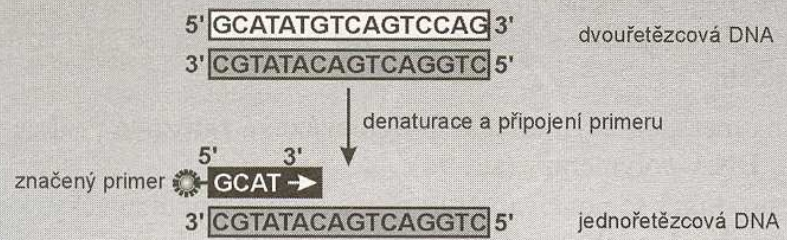
odečet
sekvence

3'
G
G
A
C
T
A
5'

Enzymatická(Sangerova) metoda

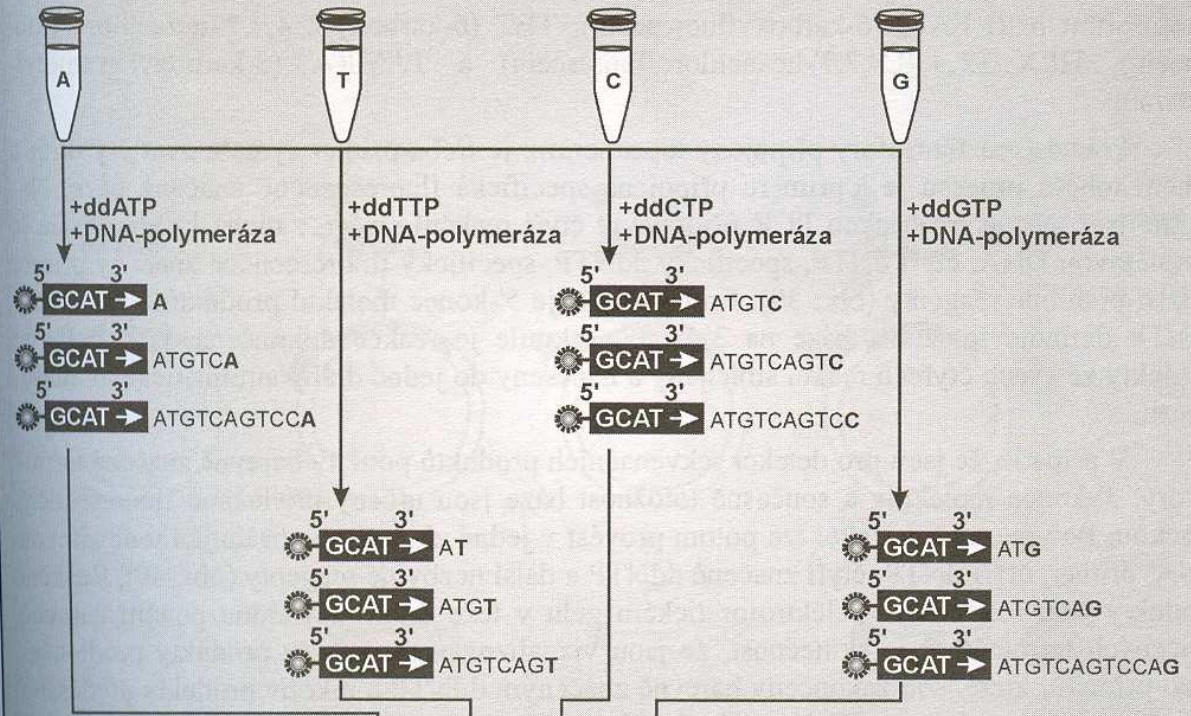
- Vytvoříme sadu stejných fragmentů ssDNA, na které navážeme primer.
- Rozdělíme do 4 zkumavek
- ssDNA s primerem slouží jako matrice pro syntézu komplementárního řetězce pomocí DNA polymerasy
- Reakce s DNA polymerasou při níž se začlení do syntetizované DNA místo normálního deoxyribonukleosidtrifosfátu jeho analog, který působí jako koncový inhibitor syntézy DNA - dideoxynukleosidtrifosfát (ddNTP). V každém ze 4 vzorků vzniknou fragmenty, které jsou zakončeny příslušným ddNTP (ddCTP, ddGTP, ddATP a ddTTP).

- Výsledkem syntézy v jedné zkumavce je směs různě dlouhých fragmentů zakončených stejnou bází.
- Po denaturaci provedeme elektroforézu: nanese na gel do 4 drah a podle vzájemné polohy proužků přečteme pořadí bází (nejvzdálenější proužek od startu představuje primer + 1 nukleotid, další primer + 2 nukleotidy atd.)

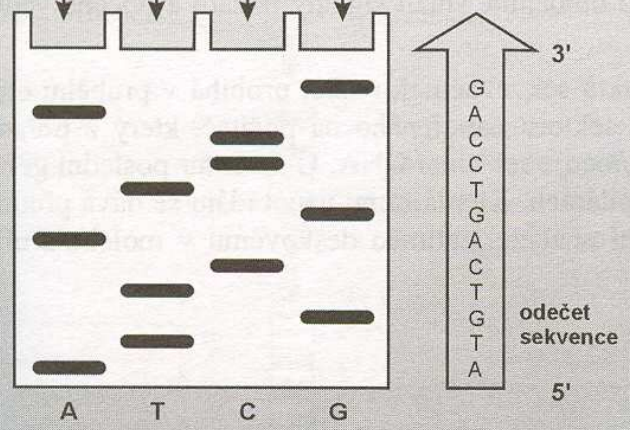


+ nadbytek dATP
 dTTP
 dCTP
 dGTP

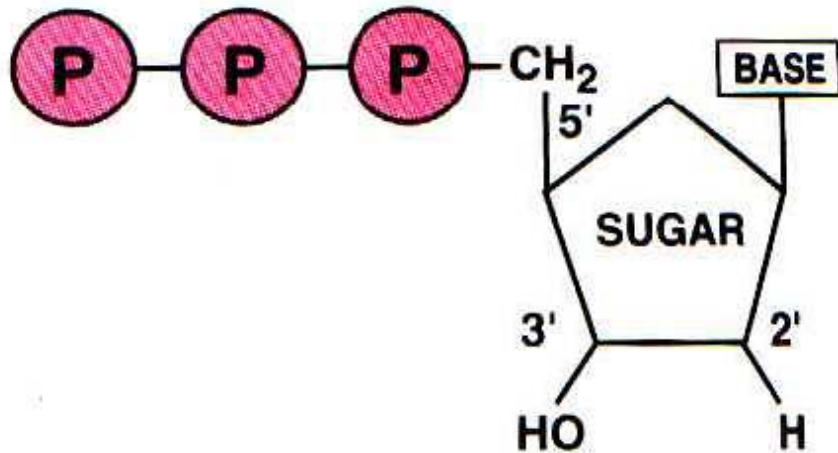
4 reakce



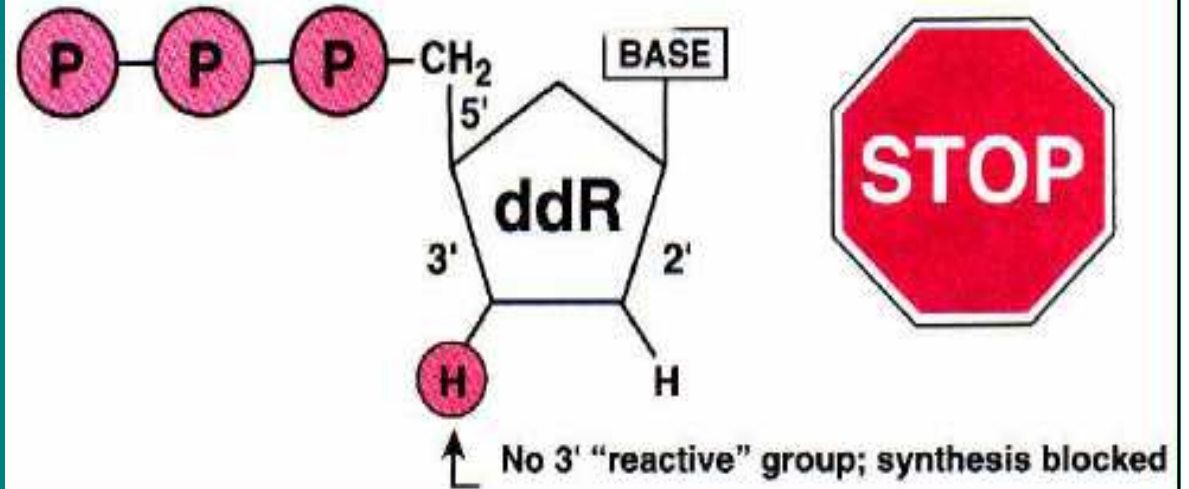
elektroforéza,
 autoradiografie



23.4 DEOXYNUCLEOSIDE TRIPHOSPHATE



23.7 DIDEOXYRIBOSE BLOCKS ELONGATION



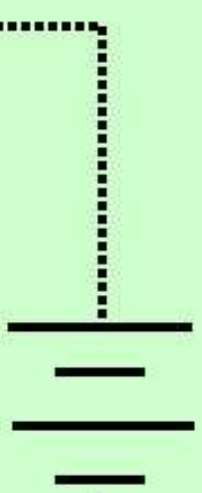
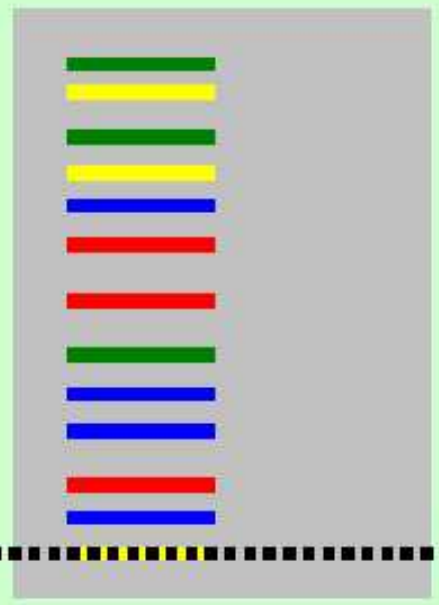
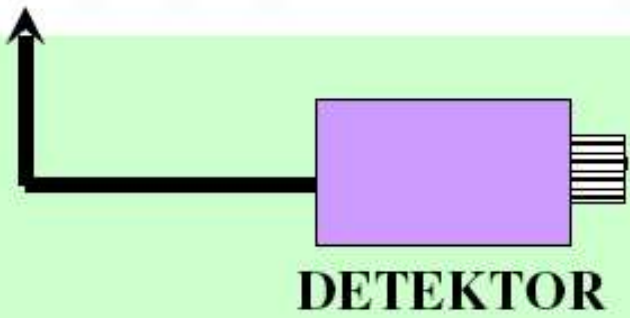
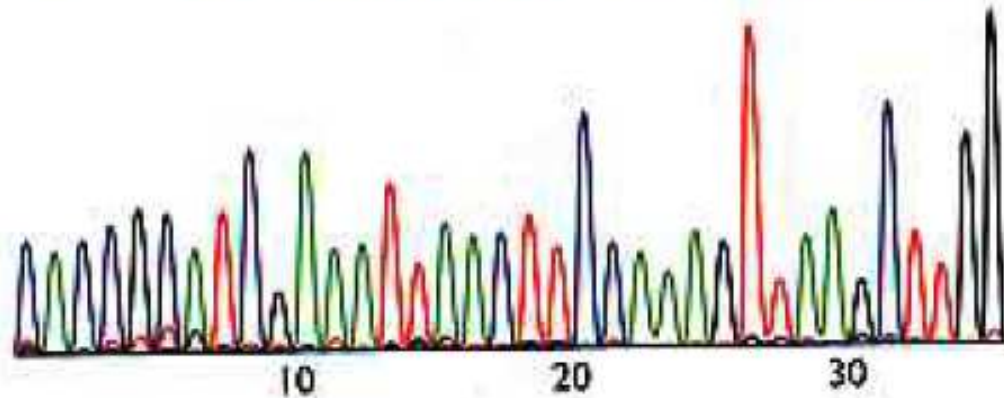
Poměr použitých bází dNTP a ddNTP je
100:1

Enzymatická metoda se používá při plně automatizovaném sekvencování, syntéza DNA probíhá v jedné reakci.

Ke značení produktů se používají čtyřmi fluorescenčními značkami označené primery nebo ddNTP.

Detekce produktů během elektroforézy probíhá pomocí laserového detektoru (laserem indukovaná fluorescence, LIF) napojeného na počítač, který vyhodnocuje sekvenci.

CACCGCATCGAAATTAAGTTCCAAAGTTAAGCTTGG



Fragmenty

- **Chemická**

- + Ekonomicky nenáročná(bez jednořet. templátů, enzymů, synt. primerů)
- + Umožňuje sekvenovat i velmi krátké oligonukleotidy
- + Umožňuje sekvenovat i oblasti s takovou sek.strukturou, kterou žádná DNA polymerasa neprorazí
- + Sekvenujeme skutečně naši DNA a nikoli její kopii vzniklou *in vitro*
- Nedají se dobře sekvenovat úseky delší než 250 b
- Nespecifičnost chemikálií

- **Enzymatická**

- + přesnější
- + jednodušší
- + možnost automatizované varianty
- + umožňuje sekvenování ručně až 400b, automaticky až 1000b

Genetický analyzátor ABI 3100

Soustava
kapilár

Vyhřívaná deska

Příprava gelu

Laserový detektor

Rezervoár pufry

Automatické nanášení vzorku



Genomové centrum zabývající se sekvencováním



Dobrou chut'!!!

