

Sekvencování DNA

- stanovení pořadí nukleotidů v molekule DNA (primární struktury)

Sekven**c**ování / Sekvenování
??

Sequenc**ing** / -

die Sequenz**z**ierung / -

- používají se 2 metody:
 - **Chemická (Maxamova-Gilbertova)**
 - **Enzymová (Sangerova)**
- společný rys obou metod: příprava a separace fragmentů DNA, jejichž velikost se liší o 1 nukleotid

Základní požadavky pro úspěšné stanovení sekvence:

- ❖ DNA s přesně definovanými konci
 - s místem pro vazbu primeru
 - s koncovou značkou
- ❖ Příprava souboru všech fragmentů ssDNA lišících se svou délkou o jeden nukleotid
- ❖ Přesné elektroforetické rozdělení těchto fragmentů na základě jejich délky

Chemická metoda (Maxam-Gilbert)

Sekvence je odvozena z molekuly DNA, která se chemicky degraduje v místech, kde se vyskytuje báze určitého typu na fragmenty.

Ty se následně oddělují elektroforézou.

Chemická metoda (Maxam-Gilbert)

Postup:

1. Příprava značené jednořetězcové DNA, jejíž sekvence má být stanovena
2. Rozdělení vzorku DNA do 4 částí
3. Chemická modifikace jednoho nebo dvou typů bází v náhodných místech molekuly DNA v každém vzorku
4. Štěpení molekuly DNA v místech, kde došlo k modifikaci bází
5. Elektroforéza fragmentů DNA v denaturačním polyakrylamidovém gelu
6. Autoradiografická (nebo jiná) detekce fragmentů DNA

5' - GATCAGG - 3'
3' - CTAGTCC - 5'

↓ *koncové značení a separace řetězců*

³²P-GATCAGG - 3'

↓

4 reakce *modifikace bází*

DMS k. mravenčí hydrazin hydrazin + NaCl

↓

↓

↓

↓

Piperidin

štěpení

G

A+G

T+C

C

P-GATCAG
P-GATCAGG

P-GA
P-GATCA
P-GATCAG
P-GATCAGG

P-GAT
P-GATC

P-GATC

↘

↘

↘

↘

G

A+G

T+C

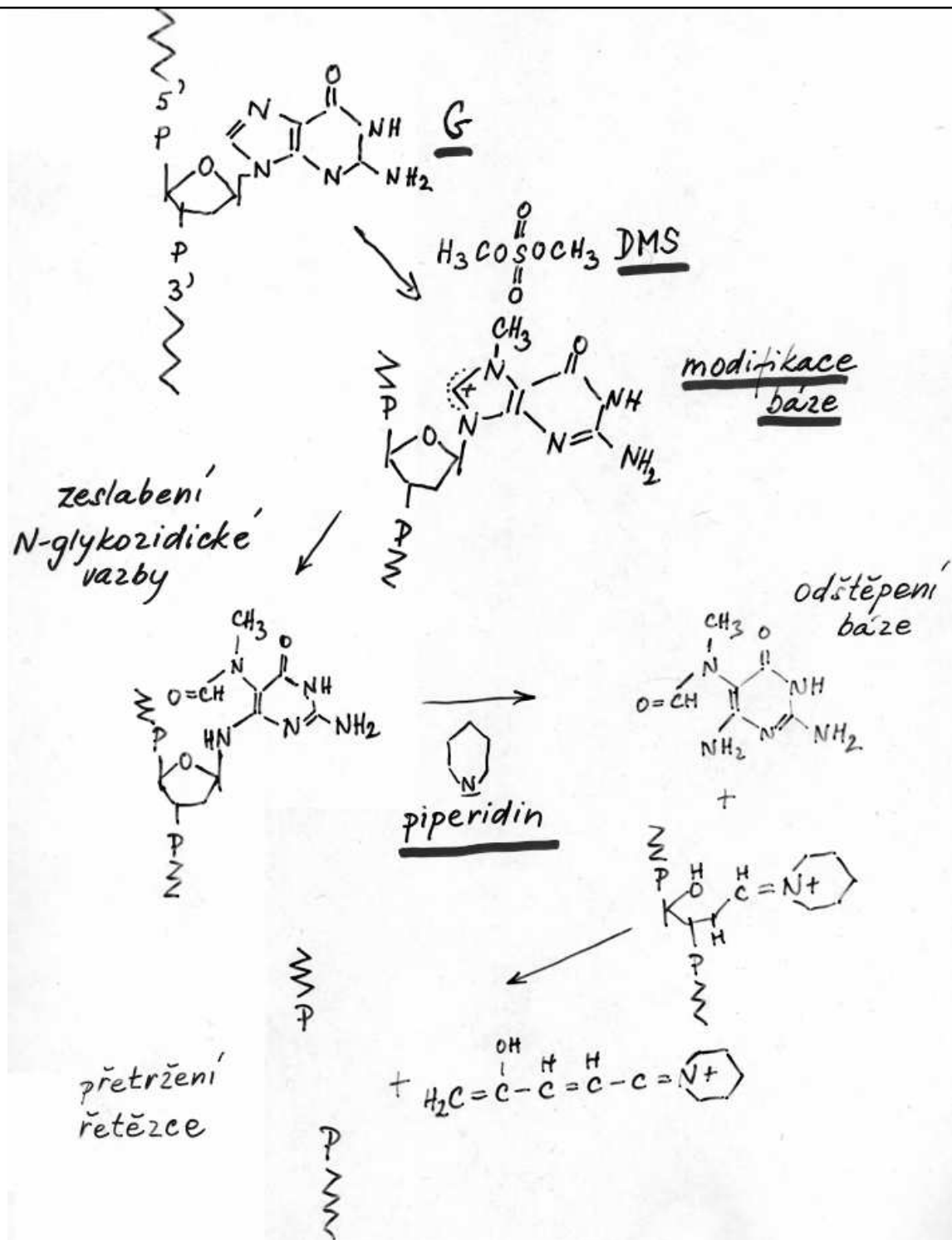
C



G
G
A
C
T
A

*elektroforéza
autoradiografie*

Princip modifikace báze a štěpení



Postup enzymatického sekvencování DNA

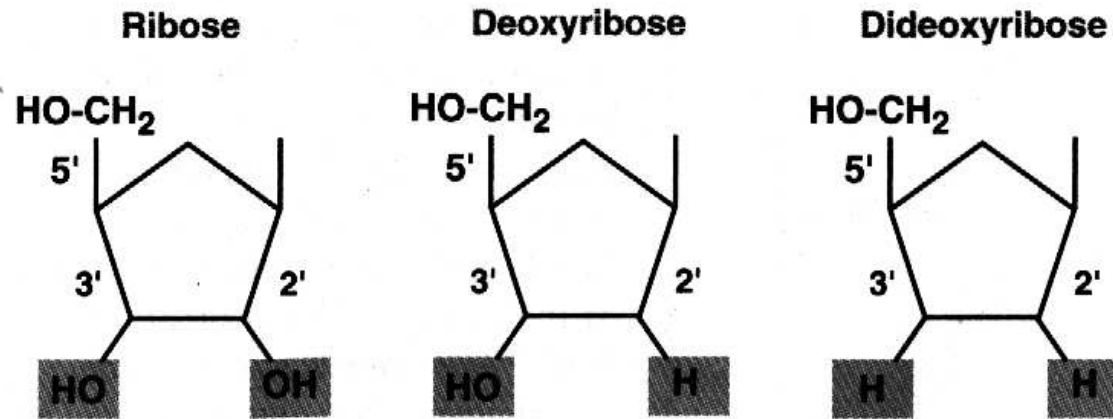
1. Příprava ssDNA jejíž sekvence má být stanovena
2. Rozdělení do 4 vzorků
3. Reakce s DNA polymerázou při níž se začlení do syntetizované DNA místo normálního deoxyribonukleosidtrifosfátu jeho analog, který působí jako koncový inhibitor syntézy DNA - dideoxynukleosidtrifosfát (ddNTP).
V každém ze 4 vzorků vzniknou fragmenty, které jsou zakončeny příslušným ddNTP (ddCTP, ddGTP, ddATP a ddTTP).

Reakce obsahuje:

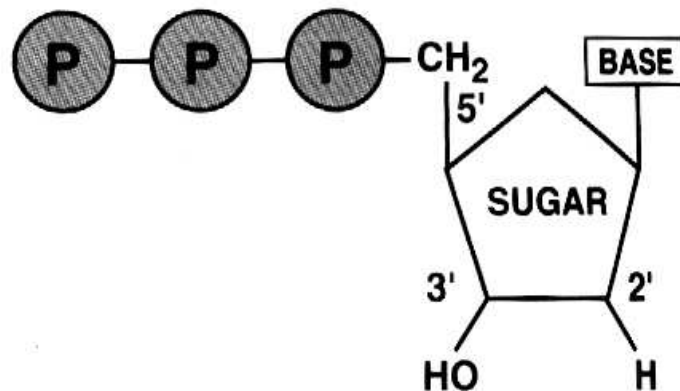
- molekulu DNA
- značený primer při pojucí se k části molekuly DNA (místo odkud začínáme stanovovat sekvenci)
- směs obsahující 4 normální nukleotidy
- jeden ddNTP (v každém ze 4 vzorků je jiný)
- DNA polymerázu

4. Denaturace produktů
5. Elektroforetická separace umožňující oddělení fragmentů lišících se délkou o jednu bázi
6. Detekce fragmentů, které nesou označený konec

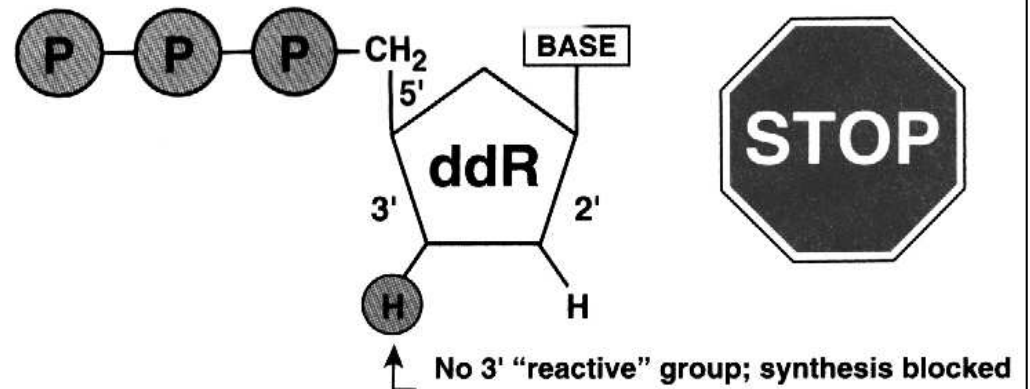
Dideoxynukleotidy nemají hydroxyl na 3'-konci



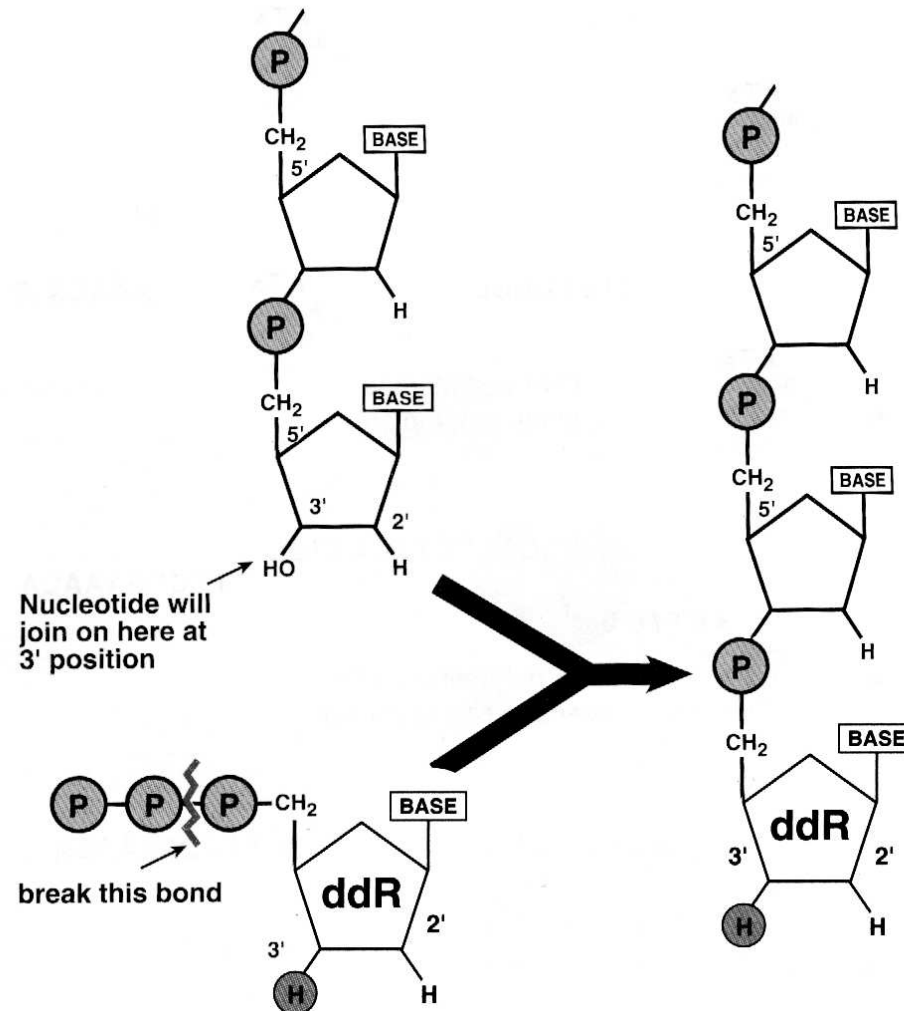
23.4 DEOXYNUCLEOSIDE TRIPHOSPHATE



23.7 DIDEOXYRIBOSE BLOCKS ELONGATION



Pokud je
dideoxynukleotid
inkorporován do
syntetizujícího se
řetězce, působí
jako terminátor
reakce



Replikace DNA s normálními deoxynukleotidy

Původní sekvence

A G C C T G G C G A C C A T C G T
T C G G A C C G C T G G T A G C A

Denaturovaný templátový řetězec

3' A G C C T G G C G A C C A T C G T 5'

Prfektní kopie

A G C C T G G C G A C C A T C G T
T C G G A C C G C T G G T A G C A

Co se stane pokud při reakci použijete směs dGTP a ddGTP?

Původní sekvence

A G C C T G G C G A C C A T C G T
T C G G A C C G C T G G T A G C A

Templátový řetězec

3' A G C C T G G C G A C C A T C G T 5'

Perfektní kopie

~~A G C C T G G C G A C C A T C G T
T C G G A C C G C T G G T A G C A~~

**Směs řetězců ukončených GUANINEM
při použití směsi dGTP a ddGTP**

T C G

T C G G

T C G G A C C G

T C G G A C C G C T G

T C G G A C C G C T G G

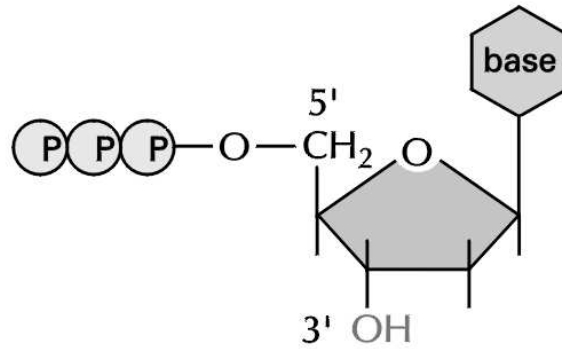
T C G G A C C G C T G G T A G

Enzymová metoda sekvencování DNA (Sanger)

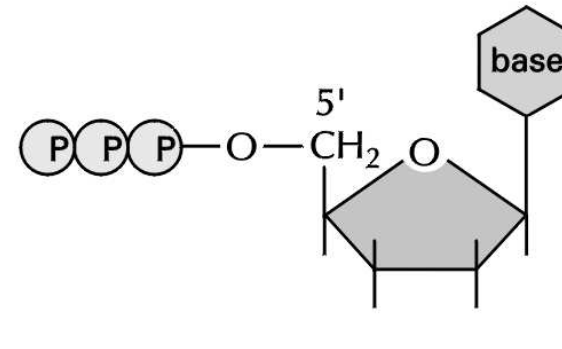
(A)

deoxyribonukleosidtrifosfát

dideoxyribonukleosidtrifosfát



je možno prodloužit řetězec na 3' -konci



není možno prodloužit řetězec na 3' -konci

(B)

normální prekursor
deoxyribonukleosidtri-
fosfátů (dATP, dCTP,
dGTP, dTTP)

malé množství jednoho
dideoxyribonukleosidtrifosfátu
(ddATP)

TCGA
TAGCTA
TATGCT
TATCGA
AATTCAT
GTCCAT
GTGGCT

oligonukleotidový primer
pro DNA-polymerázu

vzácná inkorporace
dideoxyribonukleosidtrifosfátu
DNA-polymerázou zastaví další
růst molekuly DNA



jednořetězcová DNA,
která bude sekvenována

(C)

5' GCATATGTCAGTCCAG 3'
3' CGTATACAGTCAGGTC 5' } dvouřetězcová DNA

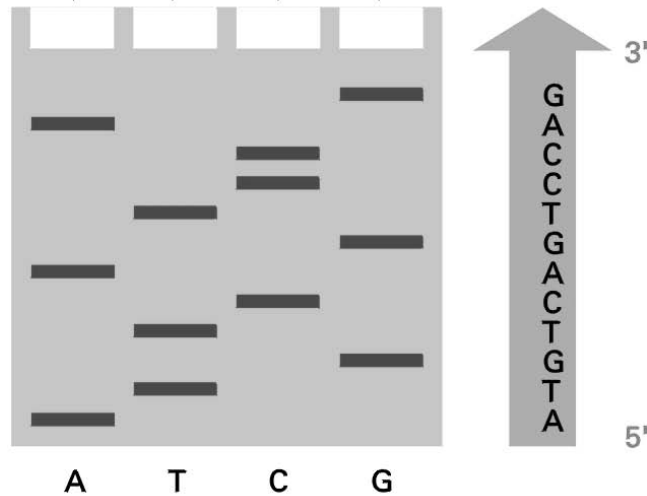
označený primer ↓

5' GCAT 3'
3' CGTATACAGTCAGGTC 5' } jednořetězcová DNA

+ nadbytek dATP
dTTP
dCTP
dGTP

+ ddATP + DNA-polymeráza + ddTTP + DNA-polymeráza + ddCTP + DNA-polymeráza + ddGTP + DNA-polymeráza

GCAT A	GCAT AT	GCAT ATGTC	GCAT ATG
GCAT ATGTCA	GCAT ATGT	GCAT ATGTCAGTC	GCAT ATGTCAG
GCAT ATGTCAGTCCA	GCAT ATGTCAGT	GCAT ATGTCAGTCC	GCAT ATGTCAGTCCAG



seq4.mov

Obraz autoradiogramu ze sekvenačního gelu

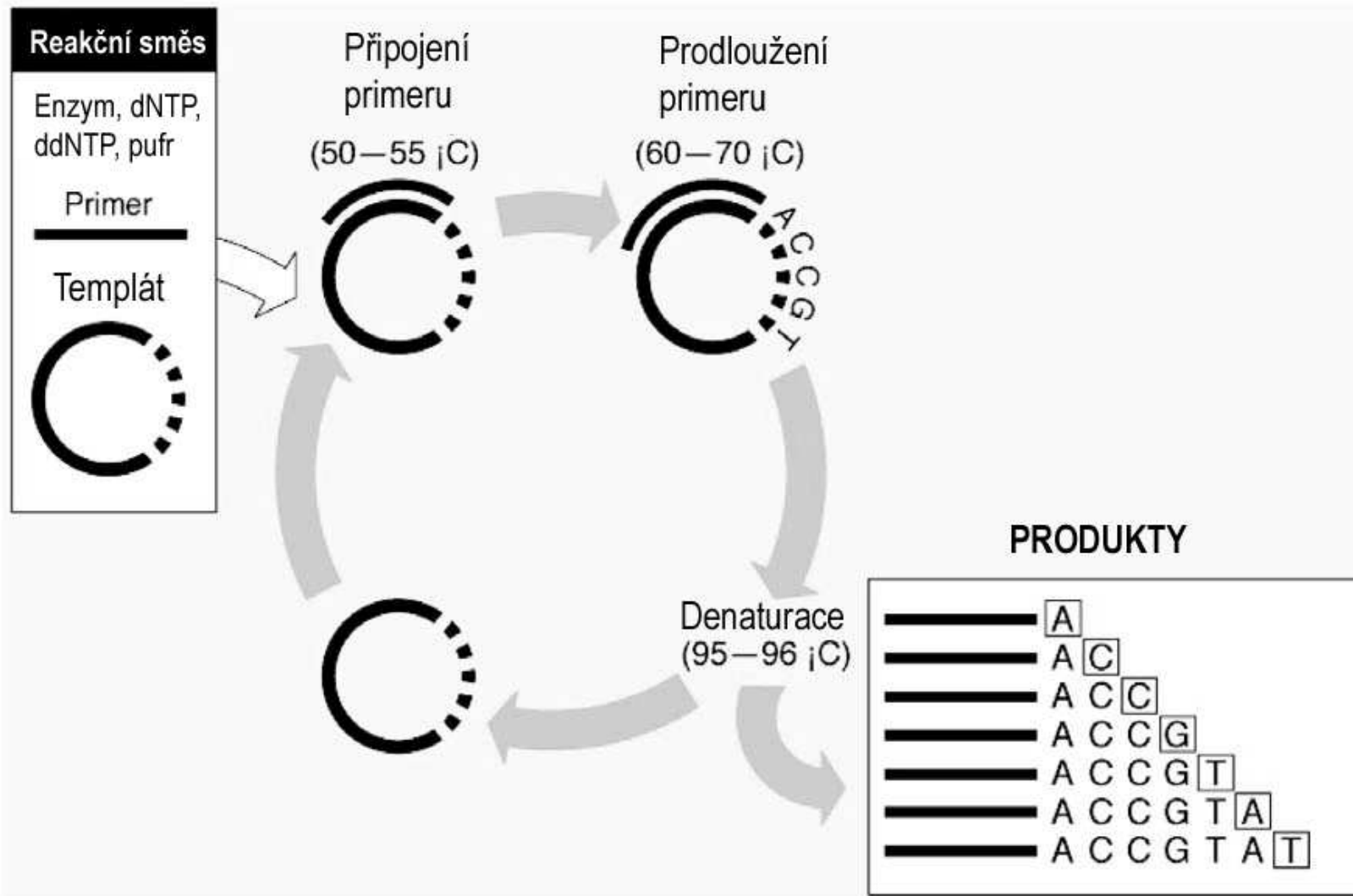


ATGC ATGC ATGC ATGC

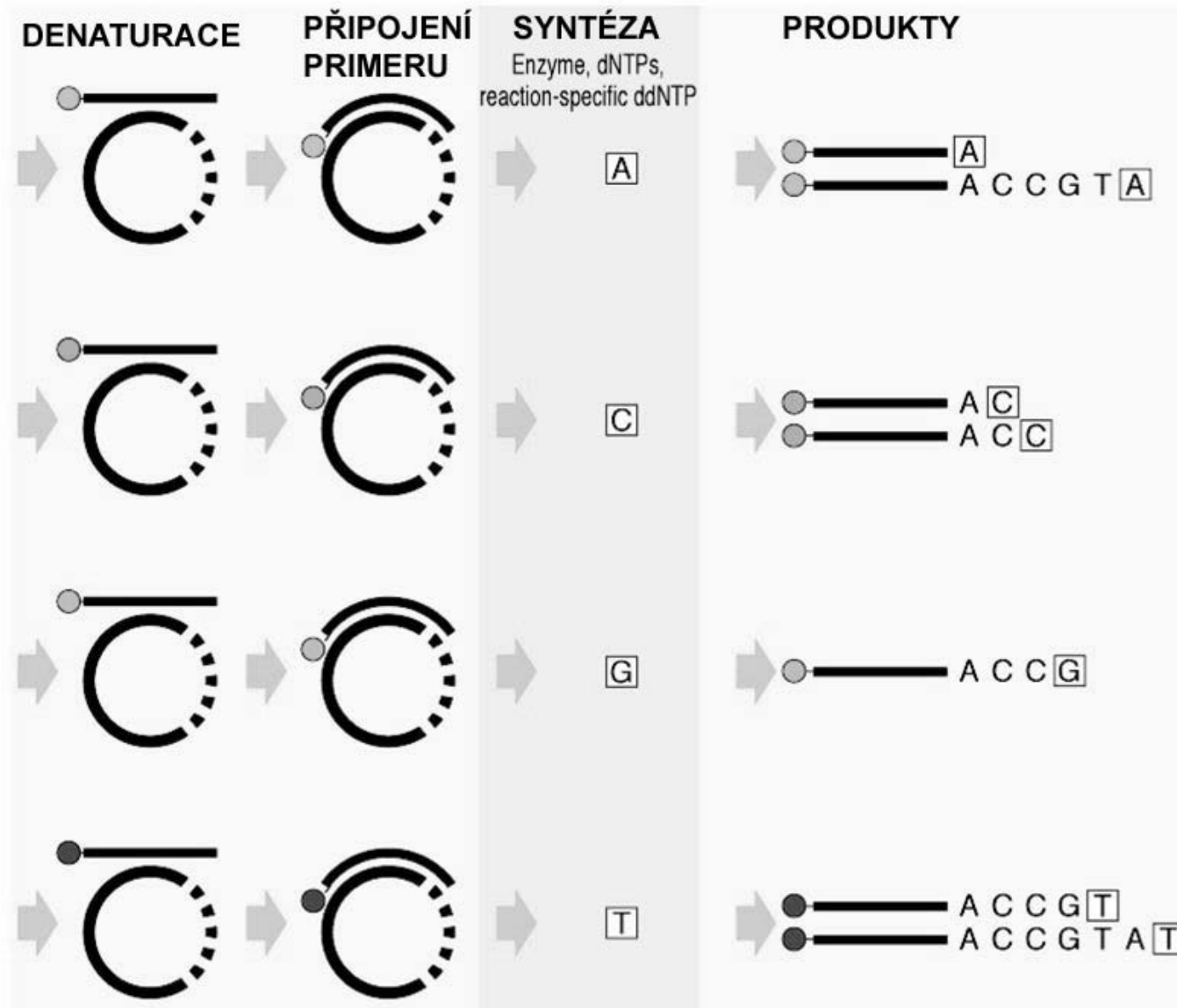
Automatické sekvencování DNA

- Je variantou enzymatického sekvencování DNA.
- Syntéza DNA probíhá v jedné reakci
- Ke značení produktů se používají čtyřmi různými fluorescenčními značkami označené
 - primery
 - dideoxyribonukleotidy

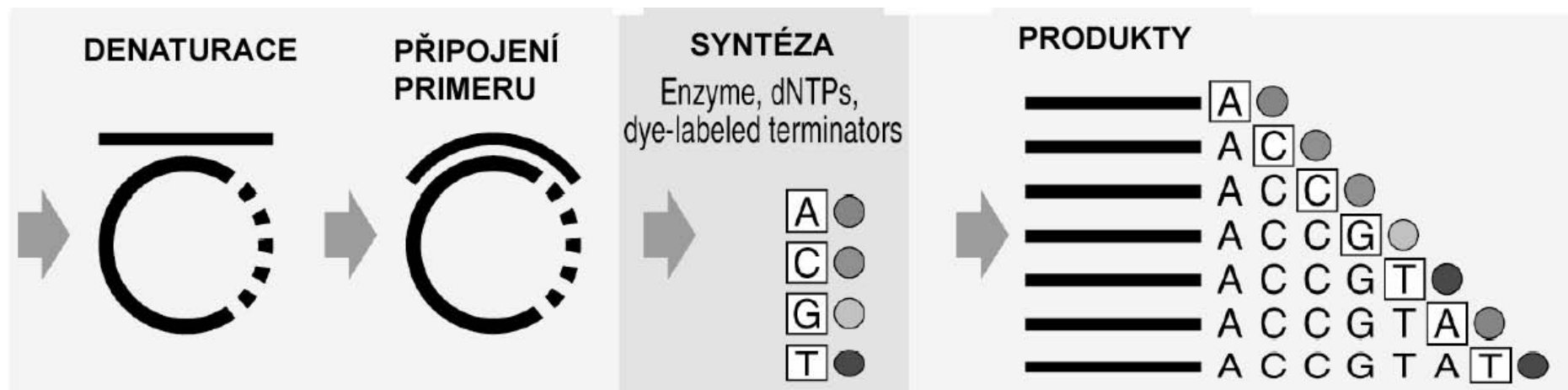
Asymetrická PCR pro sekvencování



Strategie barevných primerů

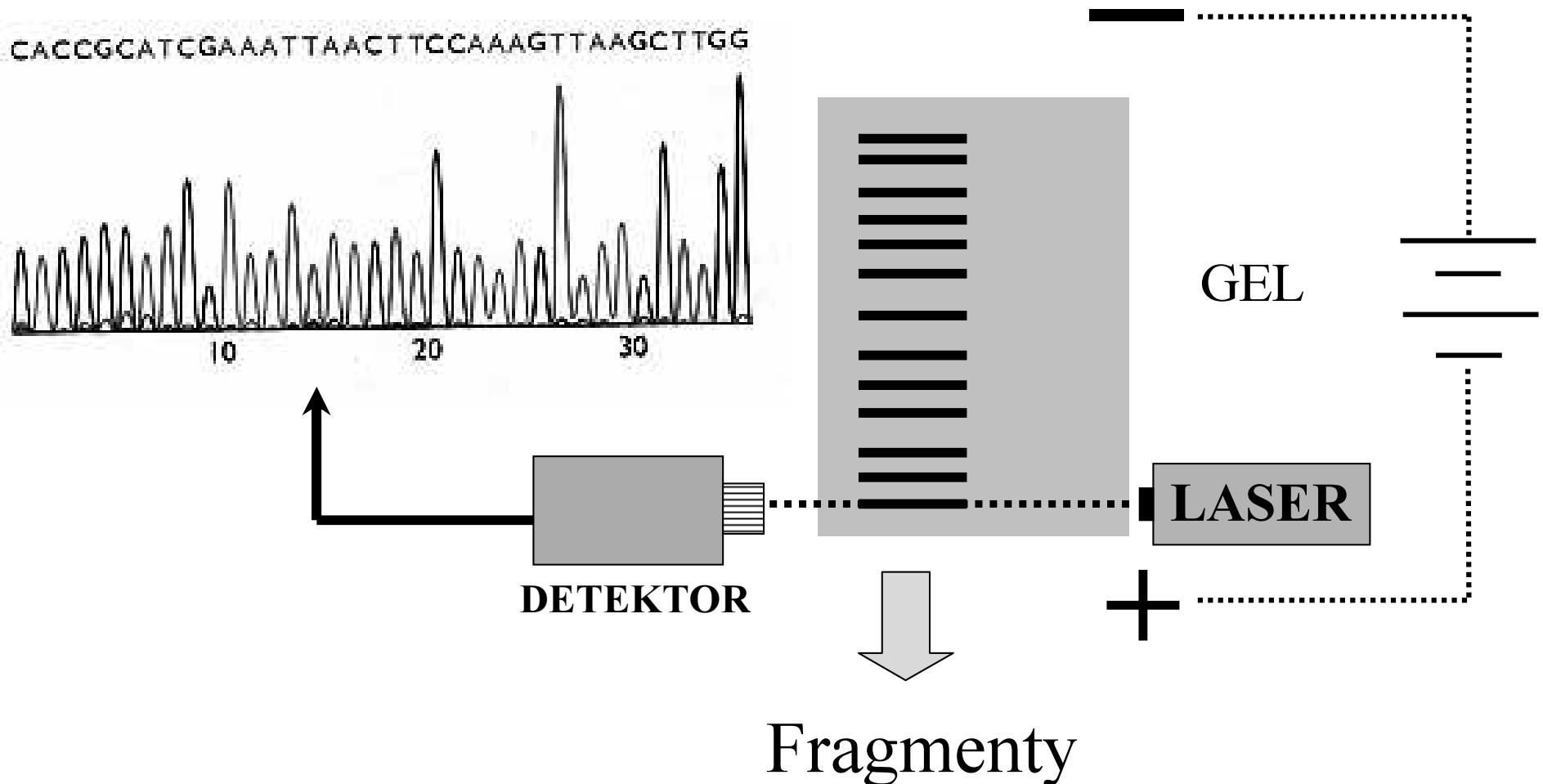


Strategie barevných terminátorů



Princip detekce produktů

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



BARVY:

- AMIDITOVÉ

HEX (černá)

6-FAM (modrá)

TET (zelená)

- ESTEROVÉ

TAMRA (černá)

JOE (zelená)

5-FAM (modrá)

filtr

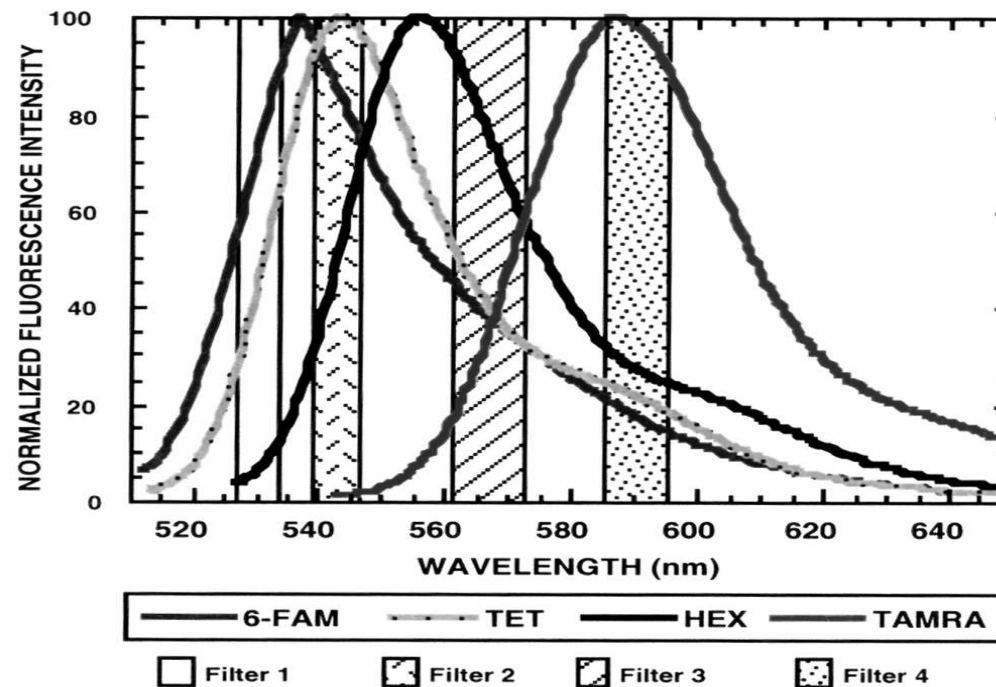
žebříček

C

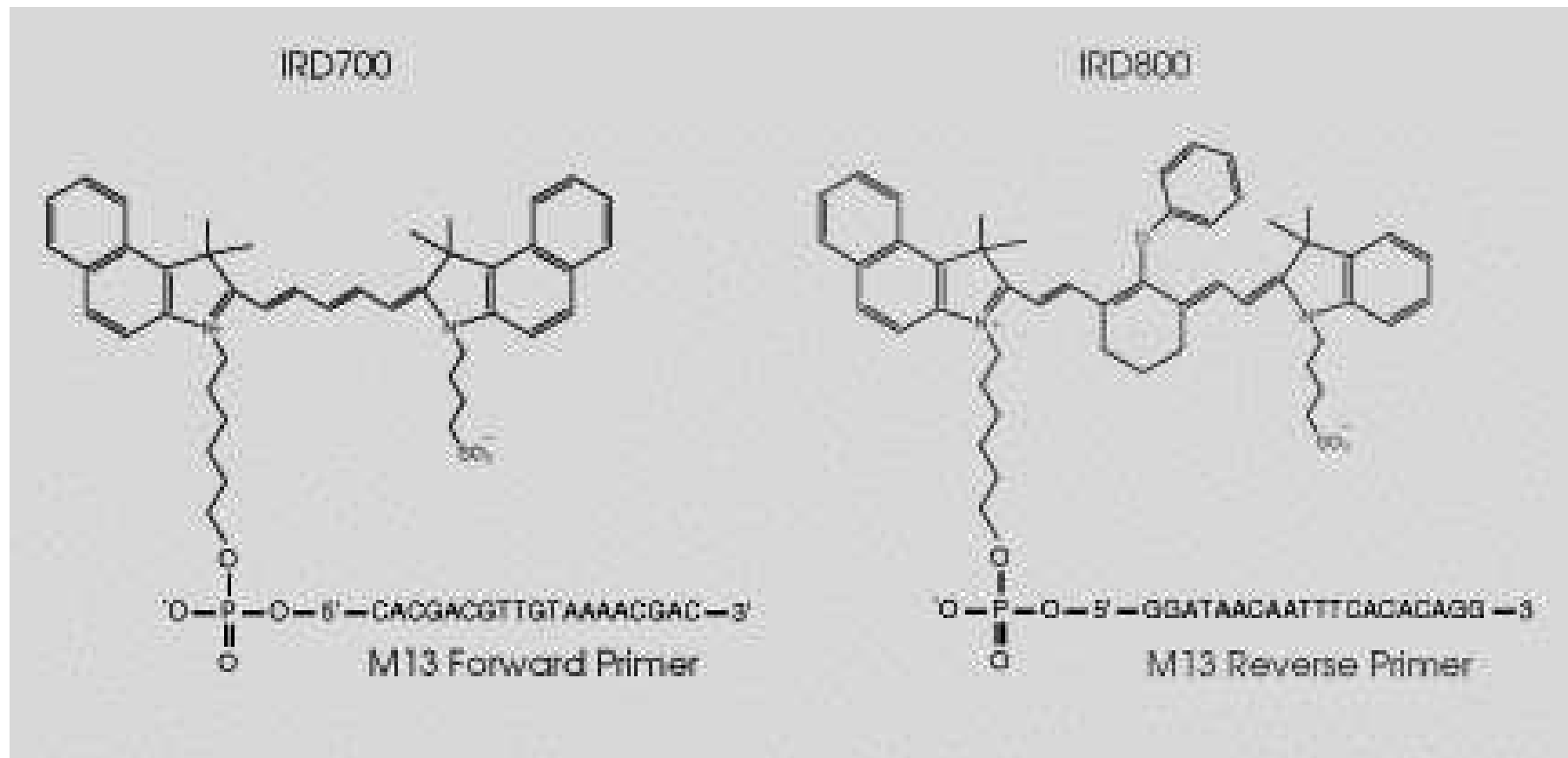
TAMRA

A

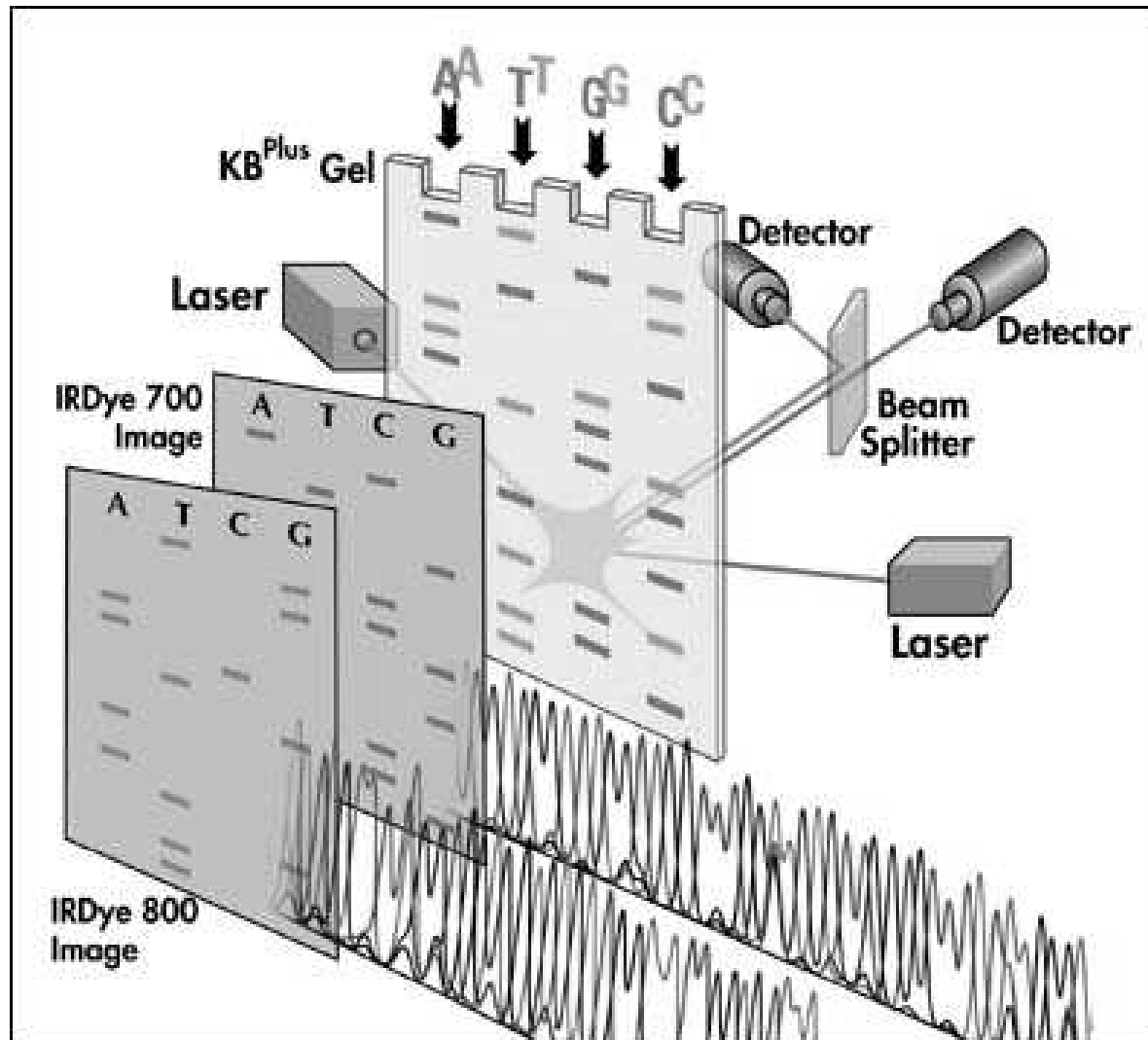
ROX



Příklad fluorescenčního značnického primeru



Vícenásobné detekce u různě značených primerů



Genetický analyzátor ABI 3100

Soustava
kapilár

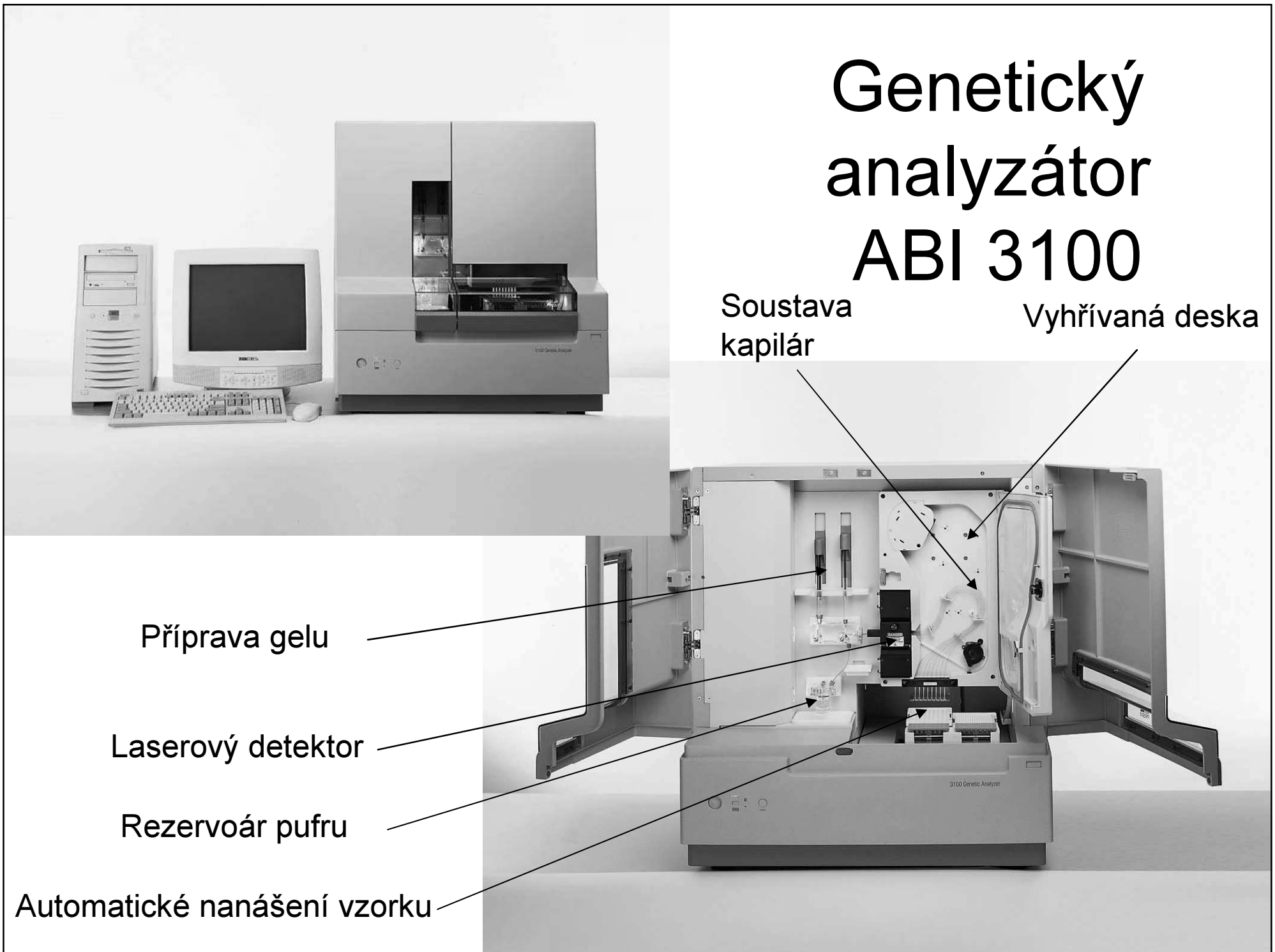
Vyhřívaná deska

Příprava gelu

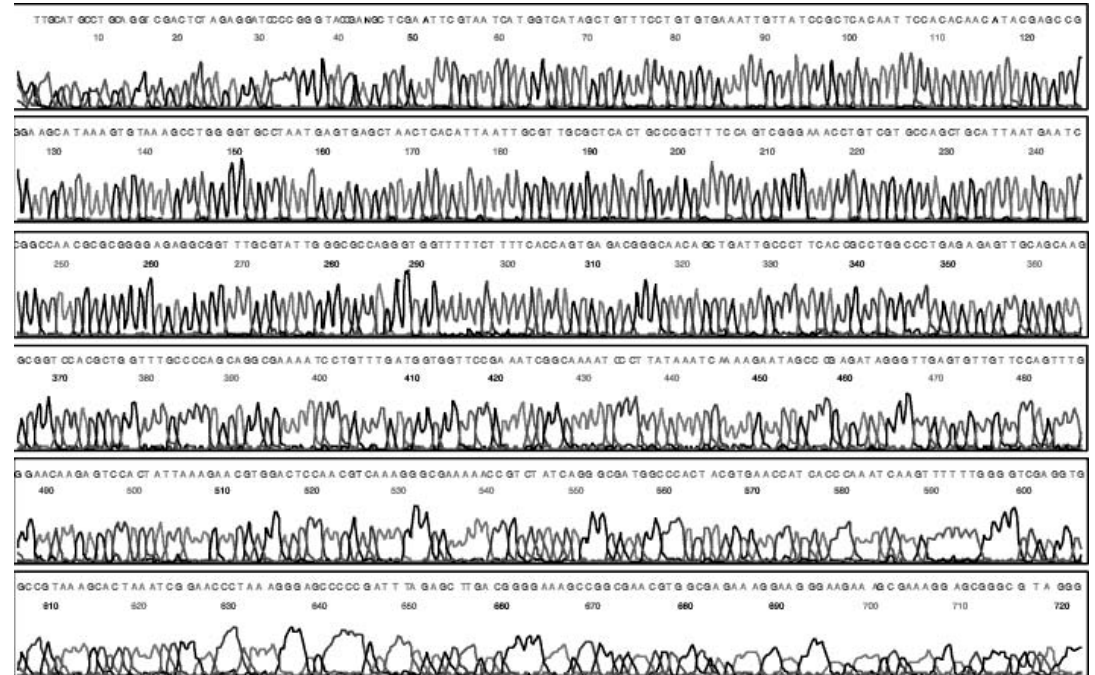
Laserový detektor

Rezervoár pufro

Automatické nanášení vzorku



Příklad výstupu



1 dráha na gelu

Genomové centrum zabývající se sekvencováním



Sekvencování genomů

V praxi je velice často potřeba stanovit sekvenci fragmentu DNA, který je delší než průměrná délka 500 – 1 000 bází dosahovaná v jedné reakci.

K tomuto účelu sekvencování genomů mohou být zvoleny dvě zcela odlišné strategie:

- náhodné sekvencování
- uspořádané sekvencování sousedních úseků

Náhodné sekvencování genomů

- Při náhodném sekvencování genomu jsou nejdříve připraveny mechanickým stříháním genomové DNA fragmenty s optimální velikostí (1 300 – 2 000 bp) a po úpravě jejich konců jsou nahodile naklonovány do vhodného vektoru za vzniku velkého počtu klonů.
- Ke štěpení DNA se využívá sonikace nebo pankreatická DNáza I za přítomnosti Mn^{2+} .

- Předpokládá se, že celková informace o sekvenci obsažená v připravených malých klonech odpovídá původní DNA a sekvence fragmentů jednotlivých klonů se vzájemně překrývají.
- Pomocí univerzálních sekvenačních primerů připojujících se k vektoru poblíž klonovacího místa jsou stanoveny sekvence krátkých úseků na koncích klonovaných fragmentů (minimálně 500 bází).
- Stanovené sekvence jsou pak použity k uspořádání klonovaných fragmentů z jednotlivých vektorů do souvislých sekvencí genomové DNA - kontigů.



Izolace DNA



Fragmentace

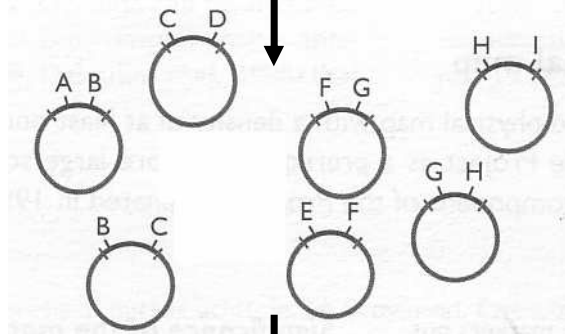


+



Vektor

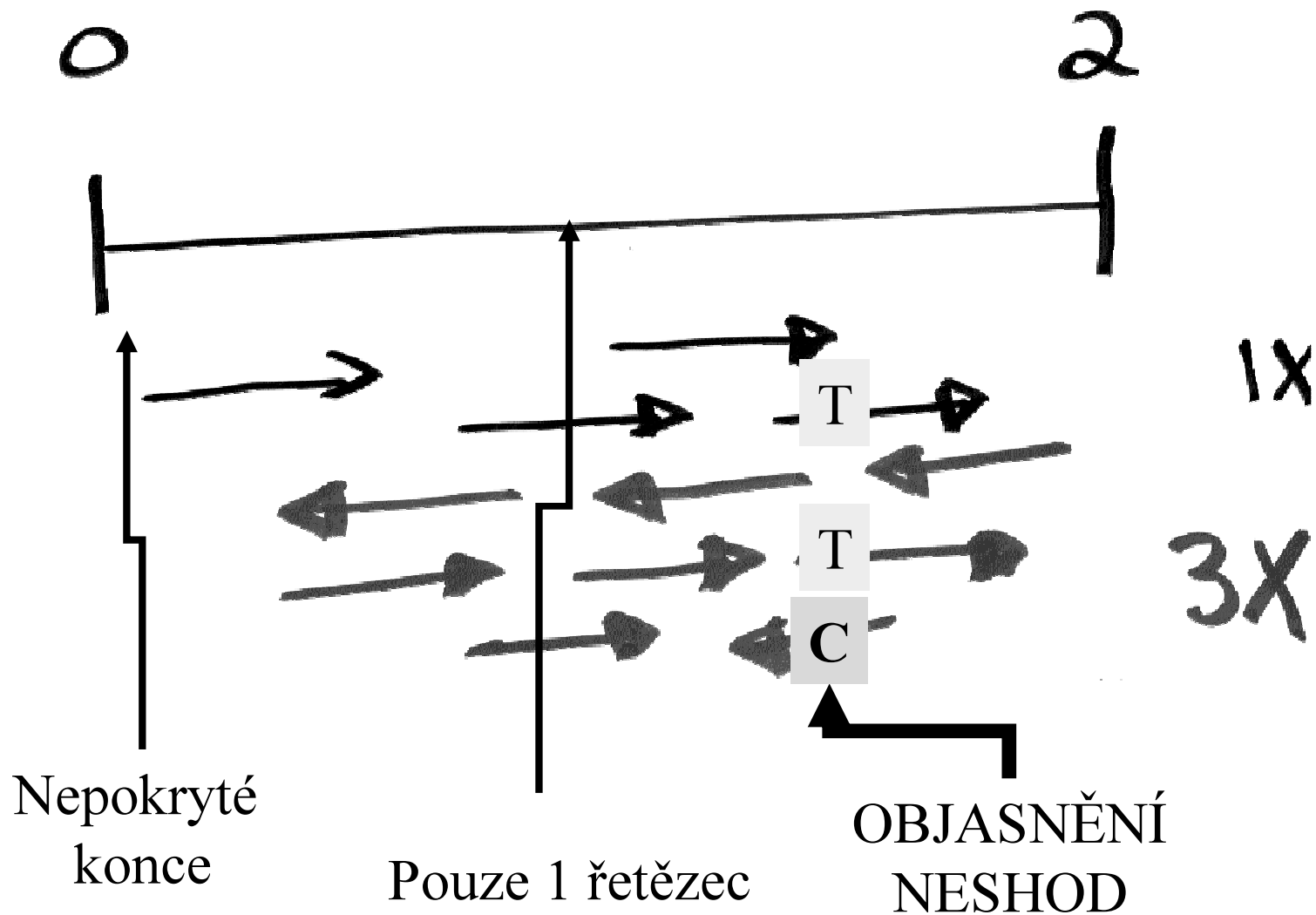
Úprava konců a klonování



Sestavení překrývajících se klonů



Náhodné sekvencování

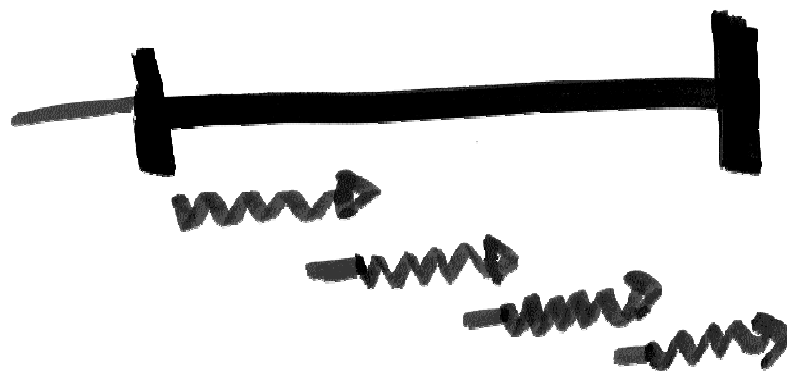


USPOŘÁDANÉ SEKVENCOVÁNÍ

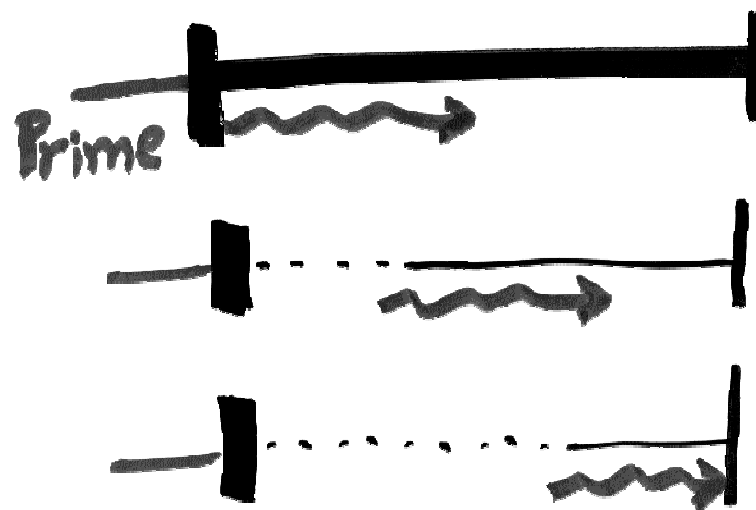
- Pro doplnění sekvence mezer zbývajících po náhodném sekvencování
- Pro sekvencování malých fragmentů DNA
- Dva odlišné přístupy:
 - **procházení primerem**
 - vyžaduje znalost sekvence, ke které se připojuje primer, který umožní prodloužení řetězce DNA-polymerázou.
 - získaná sekvence z první reakce je použita pro návrh primeru pro další reakci a tento krok se opakuje, dokud není dosaženo kompletního stanovení sekvence.
 - Tento proces nevyžaduje další klonování a minimalizuje stanovení nadbytečných sekvencí, ale správnost stanovené sekvence by měla být ověřena sekvencováním **obou řetězců**.
 - **postupné zkracování fragmentu exonukleázou a tvorba sousedících delecí**

Metody uspořádaného sekvencování

Procházení primerem

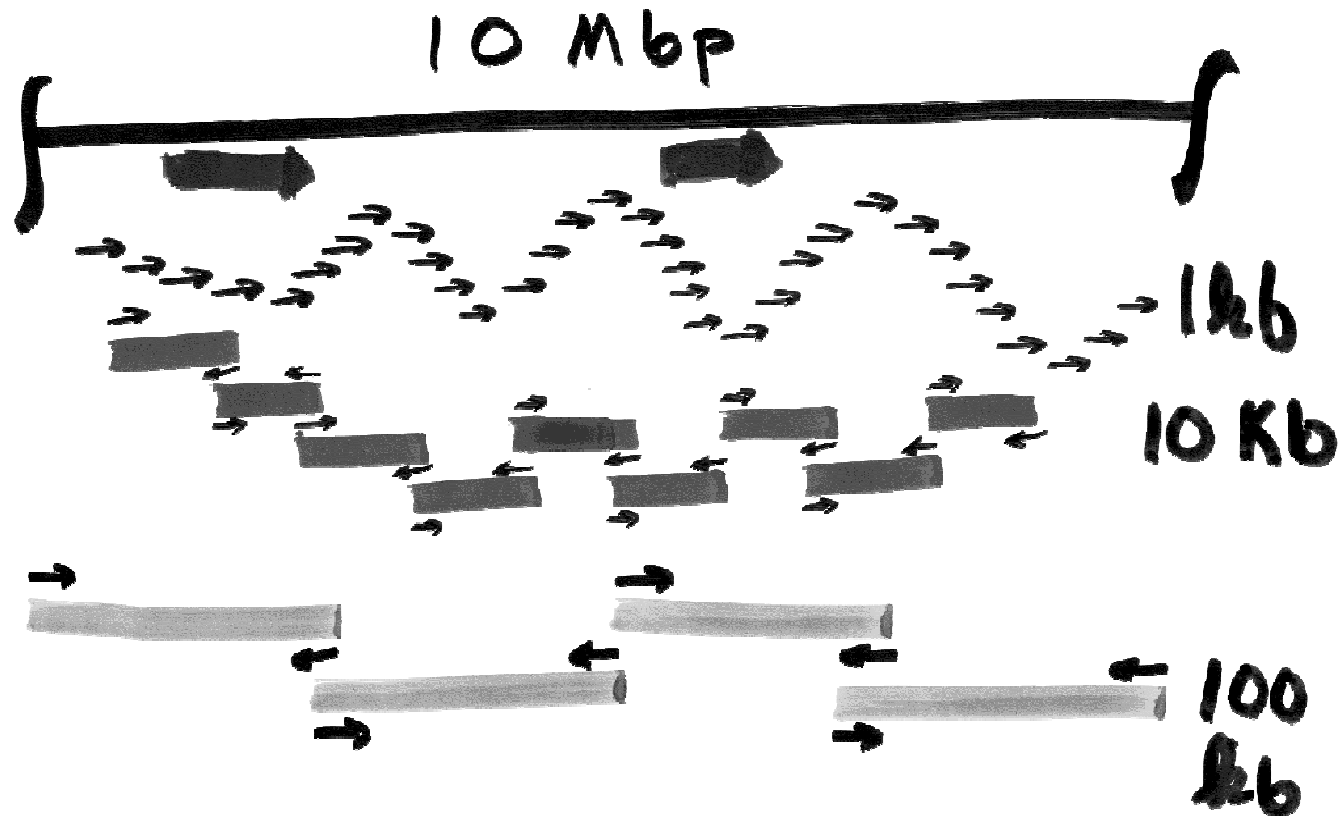


Sousední delece



DOKONČENÍ PROJEKTU

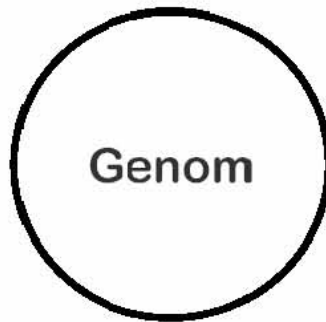
- Sestavení kontigů



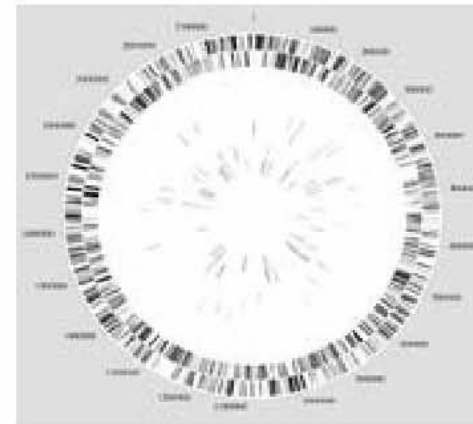
- Anotace (bioinformatika): ORF, repetice, regulační oblasti, → geny, → funkce



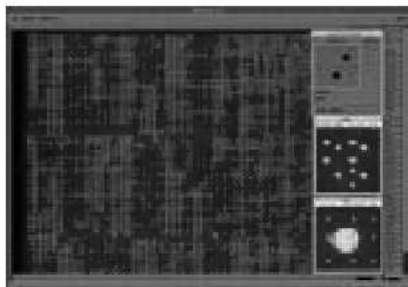
Sekvencování
Kompletace



Hledání ORF
Anotace

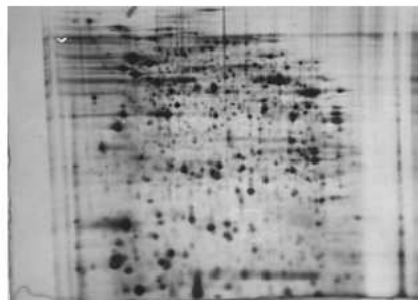


- Transkriptom
- Čipy

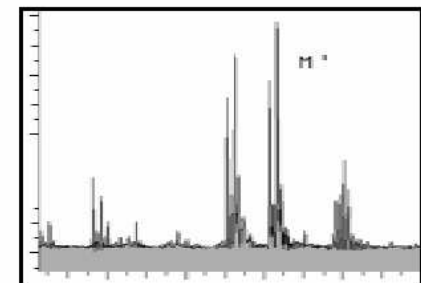


- Proteom

- 2D-Elektroforéza



- MALDI-TOF-MS

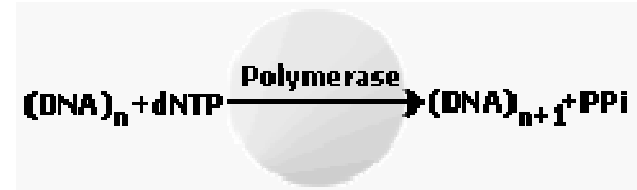


Alternativní přístupy pro stanovení sekvence DNA

- Pyrosekvencování
- Sekvencování prostřednictvím hybridizace

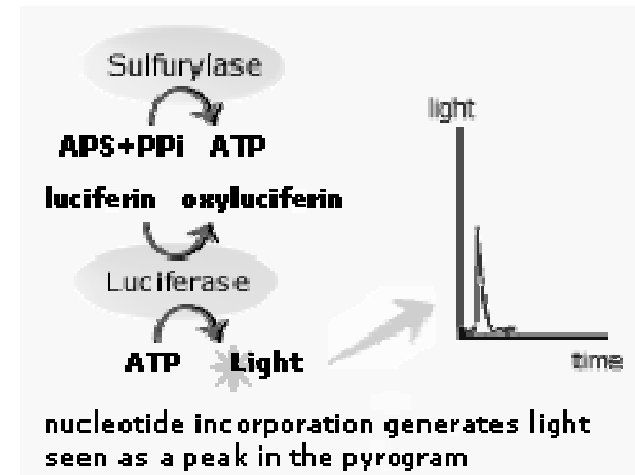
Pyrosekvencování

- Sekvencování se syntézou DNA v reálném čase nevyžadující elektroforézu ani separaci fragmentů
- Je založené na uvolnění pyrofosfátu (PPi) při enzymatické syntéze DNA
- 1. krok: Sekvenační primer hybridizuje k jednořetězcovému templátu a je inkubován s:
 - DNA polymerázou
 - ATP sulfurylázou
 - Luciferázou
 - Apyrázou
 - substrátem, adenosin 5'-fosfosulfátem (APS)
 - luciferinem
- 2. krok: První ze 4 dNTP – dATP je přidán k reakci
 - Pokud je na matrici komplementární báze, DNA polymeráza katalyzuje připojení nukleotidu k primeru
 - Pokud na matrici není komplementární báze nukleotid bude degradován apyrázou
 - Postupně budou přidány jeden po druhém všechny čtyři dNTP
 - Každé připojení nukleotidu je provázeno uvolněním pyrofosfátu (PPi) v množství ekvimolárním množství přidaného nukleotidu



- 3. krok: ATP sulfuryláza kvantitativně přeměňuje PPI na ATP za přítomnosti APS

- Vzniklý ATP umožní luciferázou zprostředkovanou konverzi luciferinu na oxyluciferin, který vytvoří světelný záblesk zaznamenaný detektorem fotonů a zobrazený jako pík na pyrogramu



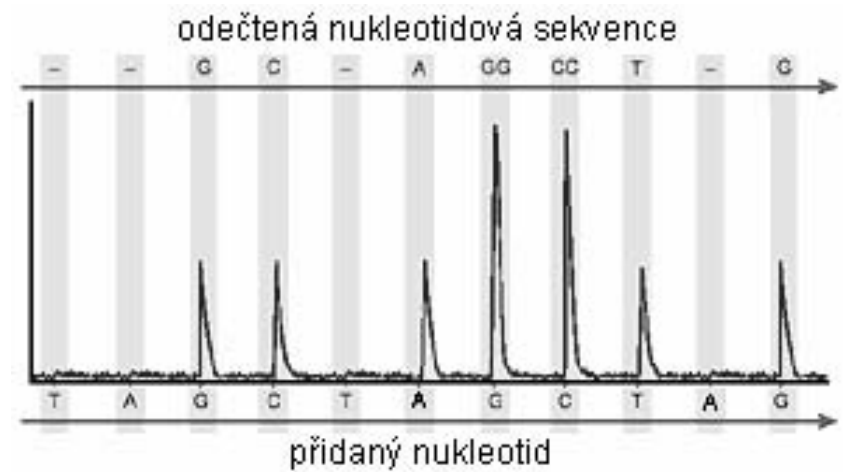
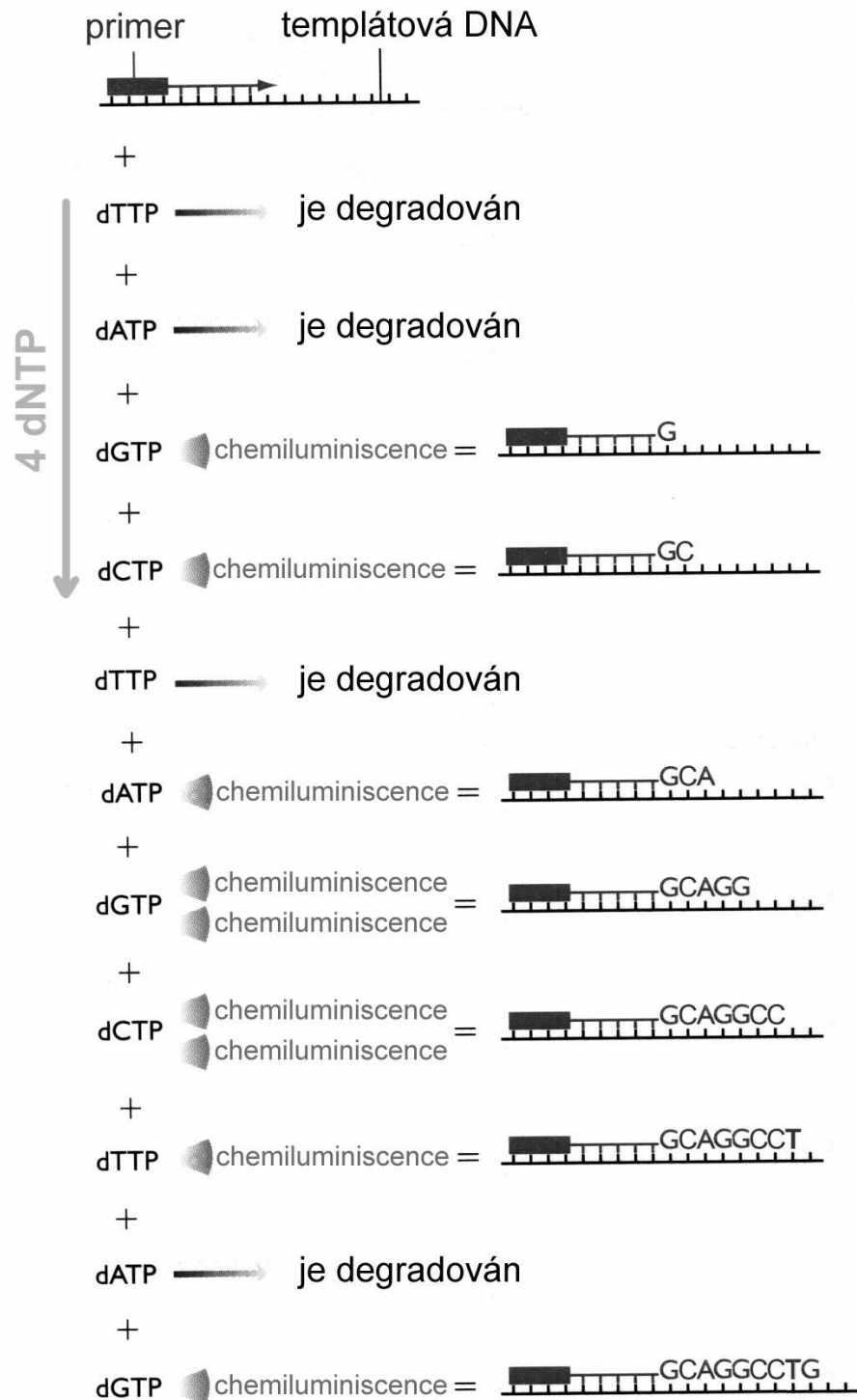
- 4. krok: Apyráza degraduje nepřípojené dNTP a nespotřebované ATP



- Až je degradace kompletní je přidán další dNTP, který je v pořadí
- Proces se znovu opakuje a sekvence je odečítána z pyrogramu
- Namísto standardního dATP je používán α -thiosubstituovaný dATP, který je přijímán DNA polymerázou, ale nikoli luciferázou
- Metoda je ve vývoji a je používána pro identifikaci jednonukleotidových polymorfizmů (SNPs)

Princip pyrosekvencování

pyrogram



Pyrosekvencování

Výhody

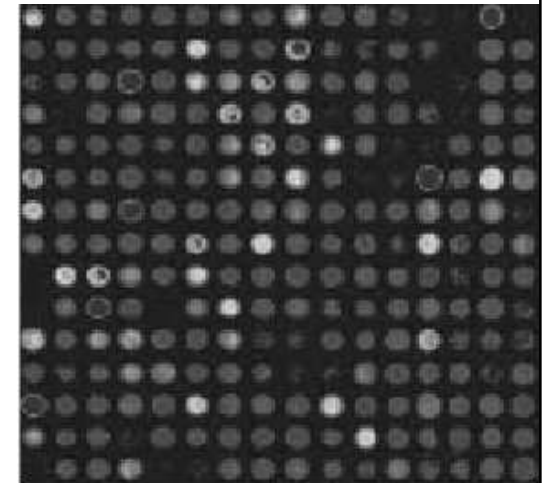
- Vysoká přesnost
- Flexibilita a možnost paralelního zpracování velkého množství vzorků
- Snadná automatizace
- Nevyžaduje elektroforézu a značené primery

Nevýhody

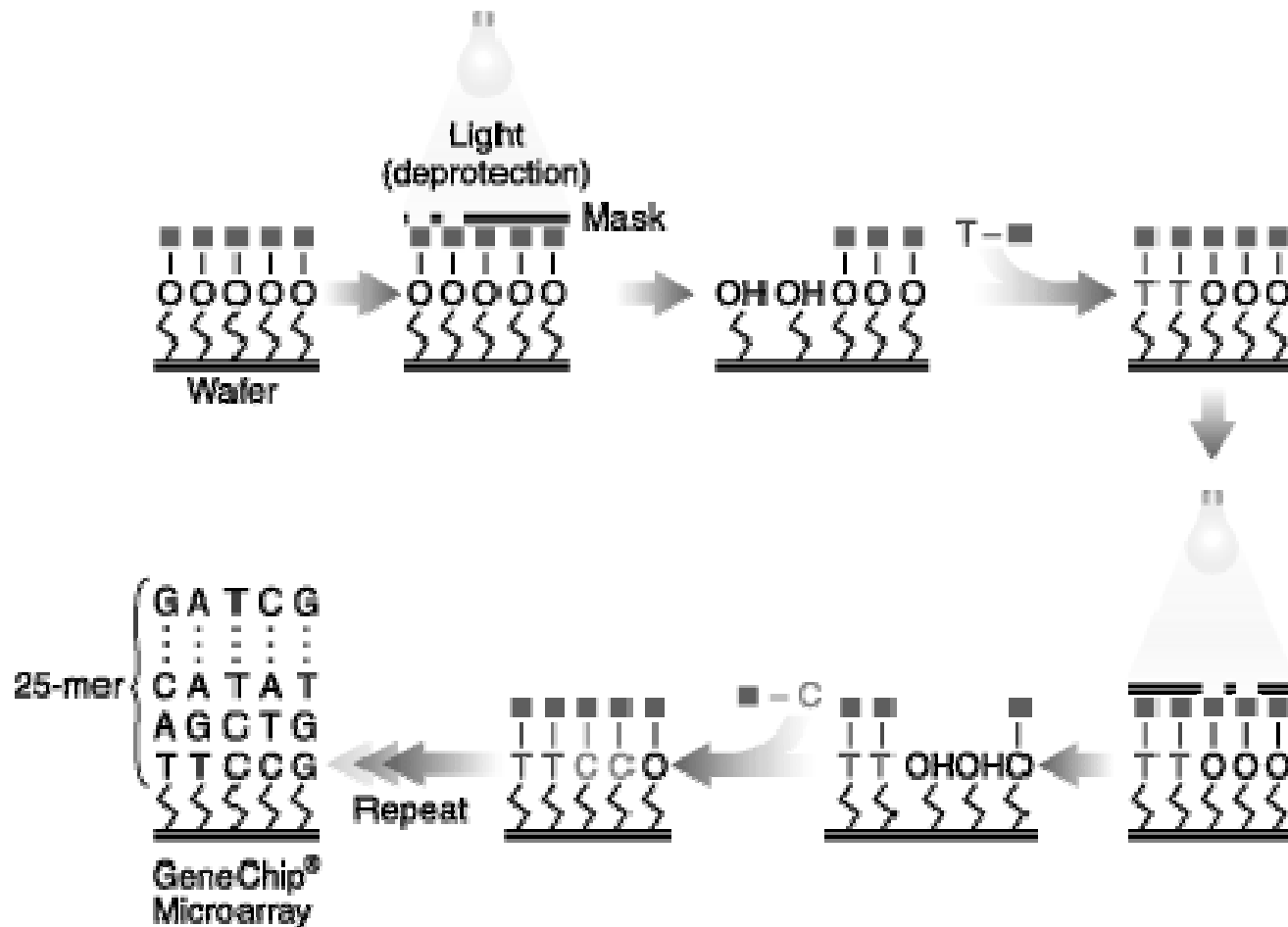
- Rychlost pyrosekvencování je cca 1 odečtená báze/min.
- Běžná délka stanovené sekvence je cca 100 bp

DNA čipy (microarrays) pro hybridizační analýzu

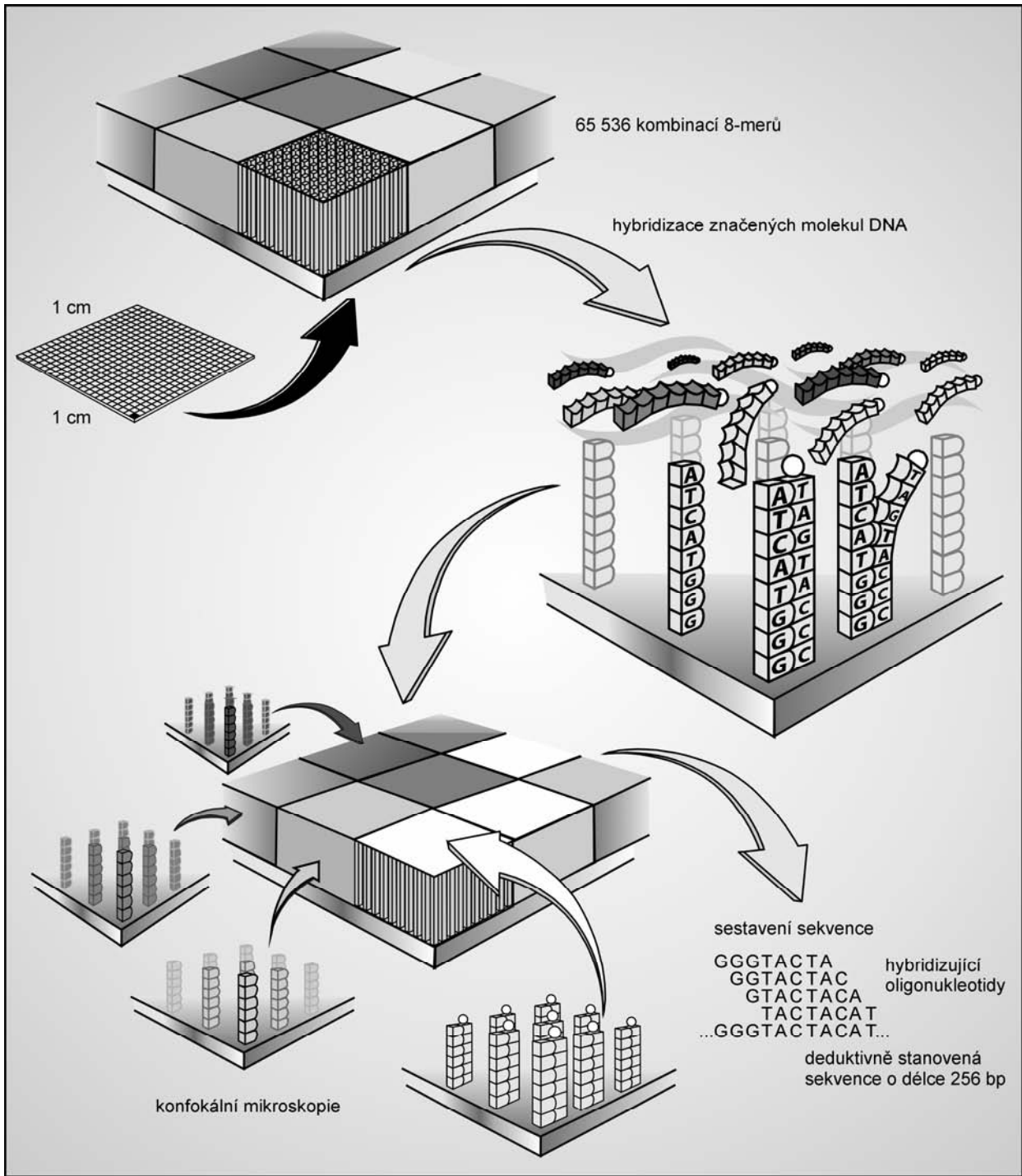
- DNA čipy slouží k paralelnímu provádění DNA hybridizace testované DNA s velkým počtem (desetitisíce) sond.
- Jejich hlavní aplikací je vyhledávání polymorfizmů, např. SNP, nebo srovnávání vzorků RNA izolovaných z různých buněk.
- DNA čip je malá destička nesoucí velký počet sond DNA, které se vzájemně liší svou nukleotidovou sekvencí a na čipu jsou umístěny v definovaných polohách.
- Sondy jsou
 - Krátké molekuly DNA nanášené s použitím robotických systémů na skleněný či nylonový povrch matrice „array“
 - cDNA
 - PCR produkty
 - synteticky připravené oligonukleotidy přímo na povrchu čipu



- Technologie fotolitografie umožňuje syntetizovat sondy s různou sekvencí přímo na povrchu čipu a dosáhnout tak na stejné ploše podstatně vyšší hustoty sond (až milion oligonukleotidů na cm²).



- Prakticky se při práci s DNA čipy postupuje tak, že je čip inkubován se značenou cílovou DNA za podmínek, umožňujících hybridizaci k sondě.
- Poloha oligonukleotidové sondy, k níž se hybridizuje testovaná DNA, se stanoví detekováním emitované fluorescence na povrchu čipu pomocí konfokálního mikroskopu nebo laserového detektoru.
- Při vyhledávání jednonukleotidových polymorfizmů (SNP) je tak možné v jediném pokuse prověřit až půl milionu polymorfizmů za předpokladu, že jsou k dispozici oligonukleotidy pro obě alely každého SNP.



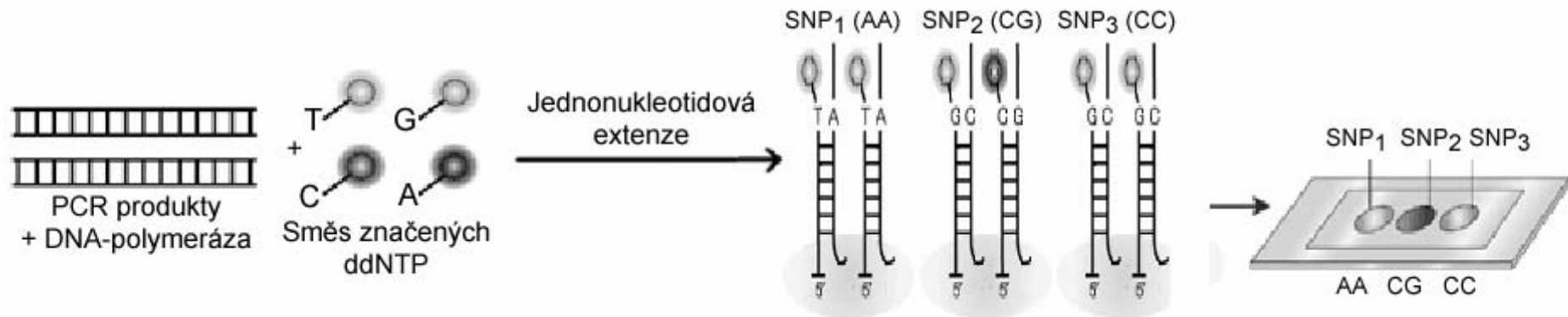
Čipy pro sekvencování pomocí hybridizace (SBH)

- Sekvencování zahrnuje:
 - Hybridizaci fluorescenčně značeného fragmentu DNA ke kompletnímu DNA čipu obsahujícímu všechny kombinace ($4^8 = 65\,536$ kombinací) 8-merů nukleotidů
 - Délka sekvence může být max. $\sqrt{65\,536} = 256$ bp
 - Výsledek hybridizace je odečten pomocí konfokálního mikroskopu
 - Sekvence je odvozena dedukcí z hybridizujících pozicí
 - Metoda je velice perspektivní, avšak v současné době je limitujícím faktorem miniaturizace společně s možností vizuální detekce
 - Pro sekvencování 1 Mb by bylo třeba vytvořit čip obsahující $1,099 \times 10^{12}$ možných 20-merů

Minisekvencování

- Metoda minisekvencování je založená na prodloužení 3'-konce primeru o jediný značený nukleotid, který slouží jako terminátor, podobně jako u Sangerova sekvencování.
- Technologie je určena pro ověření **jednonukleotidových polymorfizmů (SNP)** v sekvencích a umožňuje spolehlivě odlišit jednotlivé alely genů.
 - Primer se váže svým 3'-koncem v těsném sousedství polymorfního místa.
 - K prodloužení primeru DNA-polymerázou dojde pouze tehdy, jestliže značený nukleotid přítomný v reakci je komplementární k bázi v cílovém místě.
 - Produkty prodloužených primerů jsou analyzovány elektroforeticky a vyznačují se odlišnou pohyblivostí.

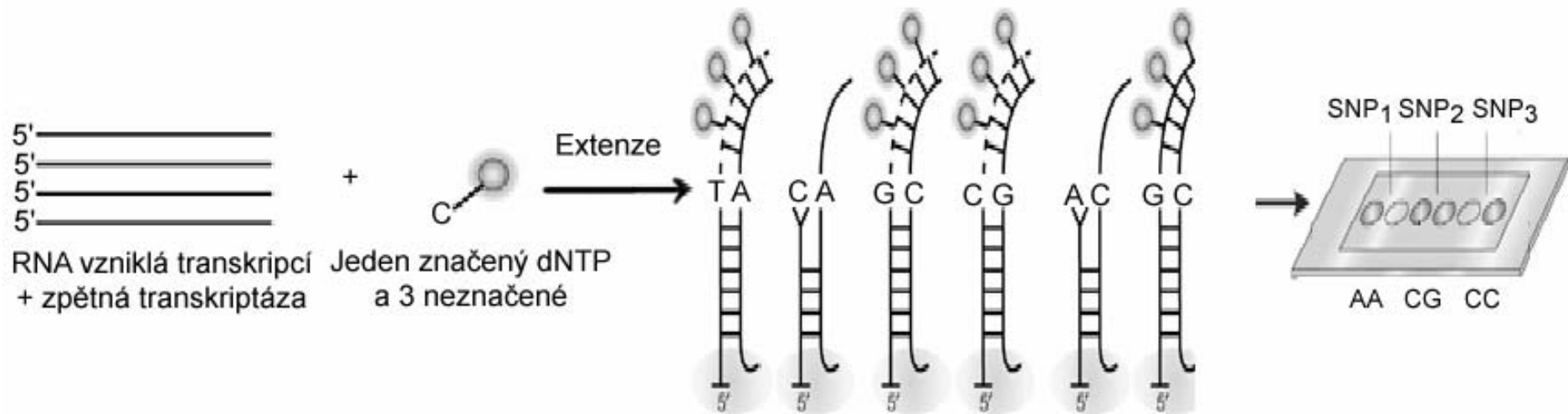
Stanovení SNP pomocí DNA čipu



1. Varianta – Prodloužení primeru vázaného na čipu

- Jeden primer pro každý SNP, který genotypizujeme je imobilizován na sklíčku.
- K čipu jsou přidány multiplex PCR produkty, 3' fluorescenčně značené ddNTPs a DNA-polymeráza.
- Proběhne prodloužení primeru o jeden ddNTP a výsledek reakce je vyhodnocen.
- Pozice primeru na čipu definuje, který SNP analyzujeme a fluorescence nukleotidu určuje genotyp příslušného SNP.

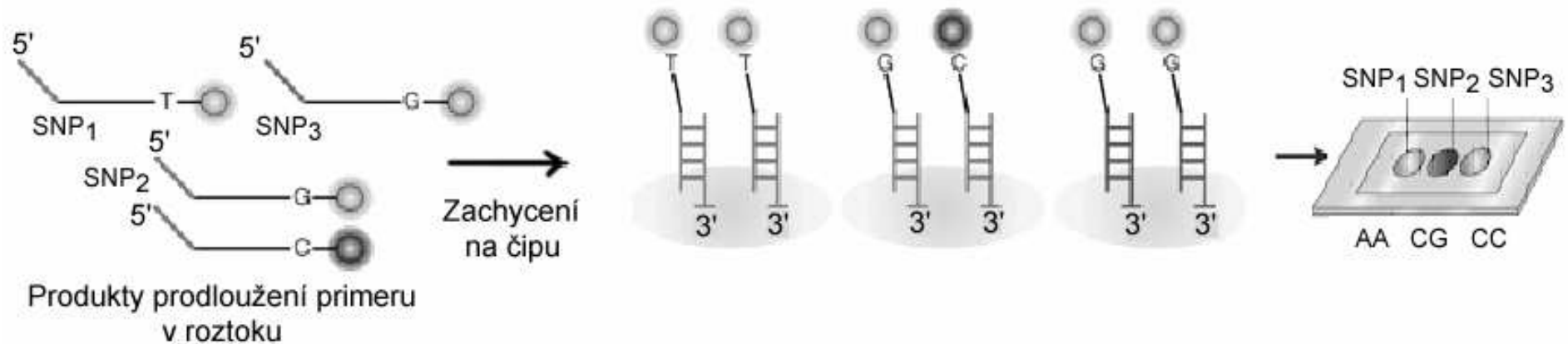
Stanovení SNP pomocí DNA čipu



2. Varianta – Alelově specifické prodloužení primeru

- Na sklíčku jsou imobilizovány dva alelově-specifické primery s bází na 3'-konci komplementární k oběma možným variantám nukleotidů v každém SNP.
- Produkty multiplex PCR jsou přepsány do mnoha kopií RNA pomocí RNA-polymerázy.
- Molekuly RNA hybridizují k čipu a slouží jako templát pro prodloužení primeru, které je katalyzované pomocí zpětné transkriptázy
- Během zpětné transkripce jsou do každého produktu začleněny fluorescenčně značené dNTP.
- Pro homozygotní genotypy je signál tvořený pouze jedním ze dvou alelově-specifických primerů kdežto u heterozygotních genotypů je signál tvořený oběma primery.

Stanovení SNP pomocí DNA čipu



3. Varianta – Prodloužení primerů nesoucích specifickou sekvencí na 5'-konci

- Cyklické prodloužení primeru o jeden dideoxynukleotid je prováděno s denaturovanou DNA v roztoku za přítomnosti
 - fluorescenčně značených ddNTPs,
 - DNA-polymerázy
 - primerů nesoucích na 5'-konci přídatnou sekvenci (tag).
- DNA-čip, který je komplementární k přídatným sekvencím primerů (tag array) je potom použit pro zachycení produktů cyklické minisekvenační reakce.