

Sekvencování DNA

- stanovení pořadí nukleotidů v molekule DNA (primární struktury)

Sekven**c**ování / Sekvenování
??

Sequenc**i**ng / -

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' - C TAGTCC - 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

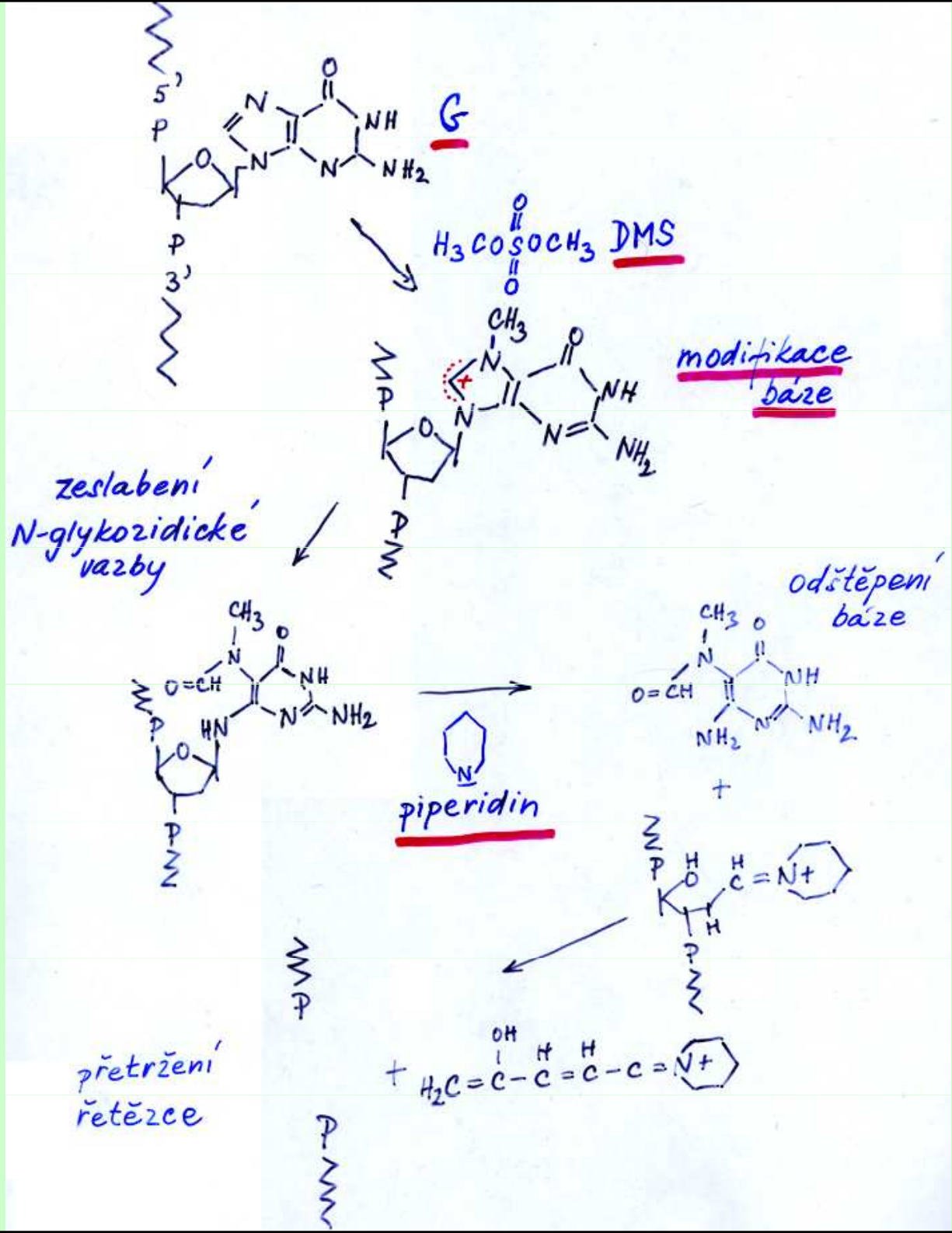
C



G
G
A
C
T
A

*elektroforéza
autoradiografie*

Princip modifikace báze a štěpení



Postup enzymatického sekvencování DNA

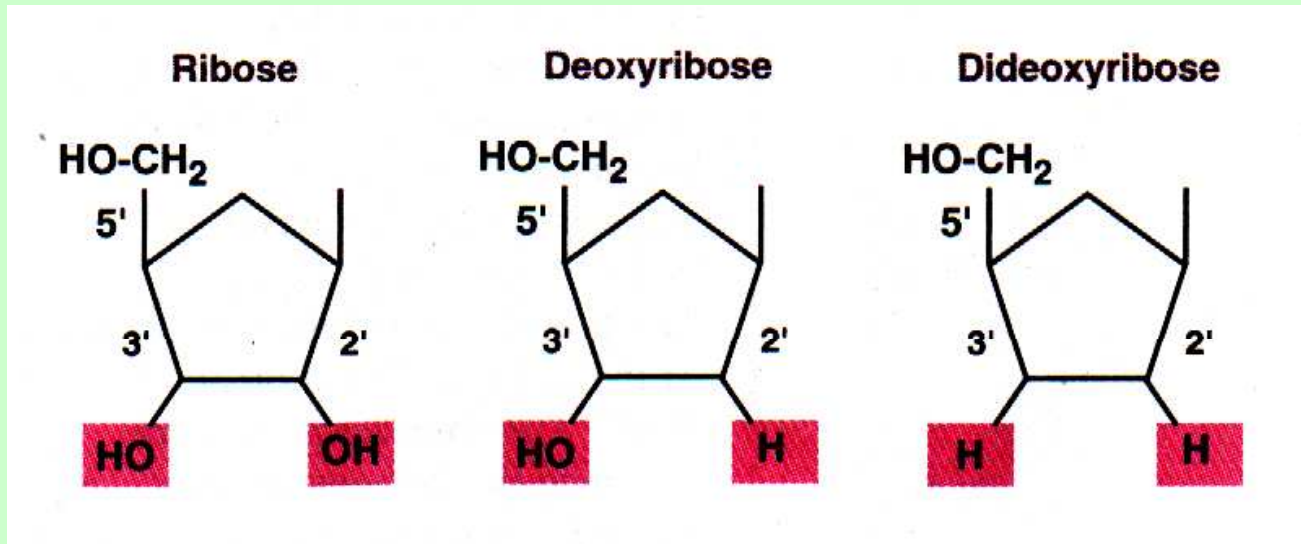
1. Příprava ssDNA jejíž sekvence má být stanovena
2. Rozdělení do 4 vzorků
3. Reakce s DNA polymerázou při níž se začlení do syntetizované DNA místo normálního deoxyribonukleosidtrifosfátu jeho analog, který působí jako koncový inhibitor syntézy DNA - dideoxynukleosidtrifosfát (ddNTP).
V každém ze 4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

Reakce obsahuje:

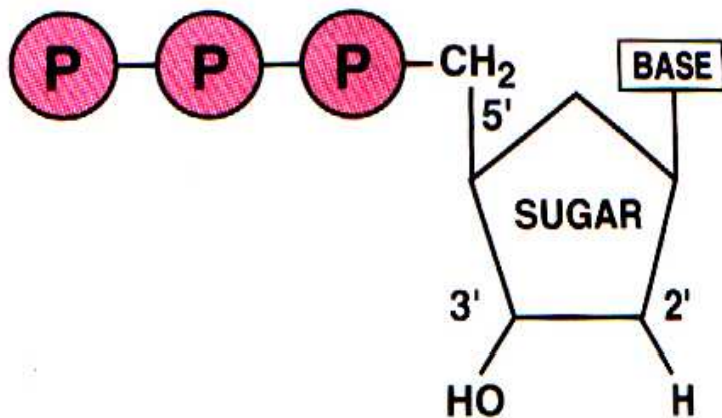
- molekulu DNA
- značený primer při pojující se k části molekuly DNA (místo odkud začínáme stanovovat sekvenci)
- směs obsahující 4 normální nukleotidy
- jeden ddNTP (v každém ze 4 vzorků je jiný)
- DNA polymerázu

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

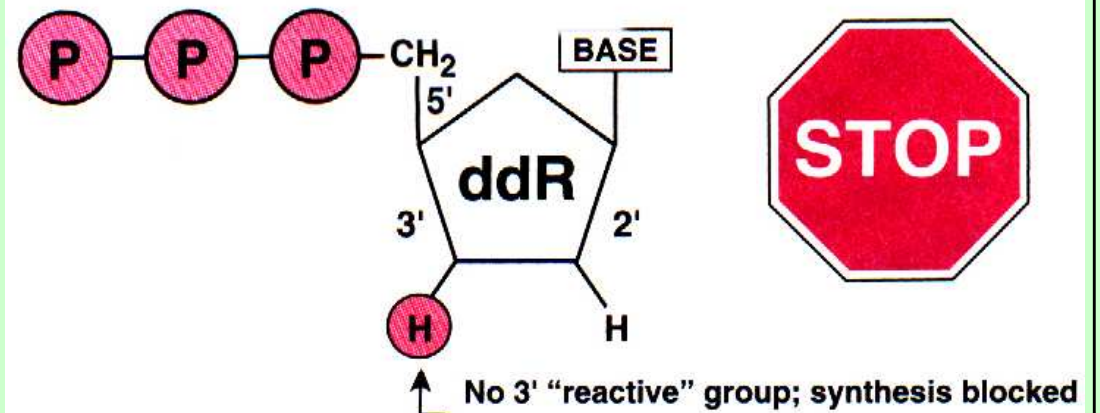
Dideoxynukleotidy nemají hydroxyl na 3'-konci



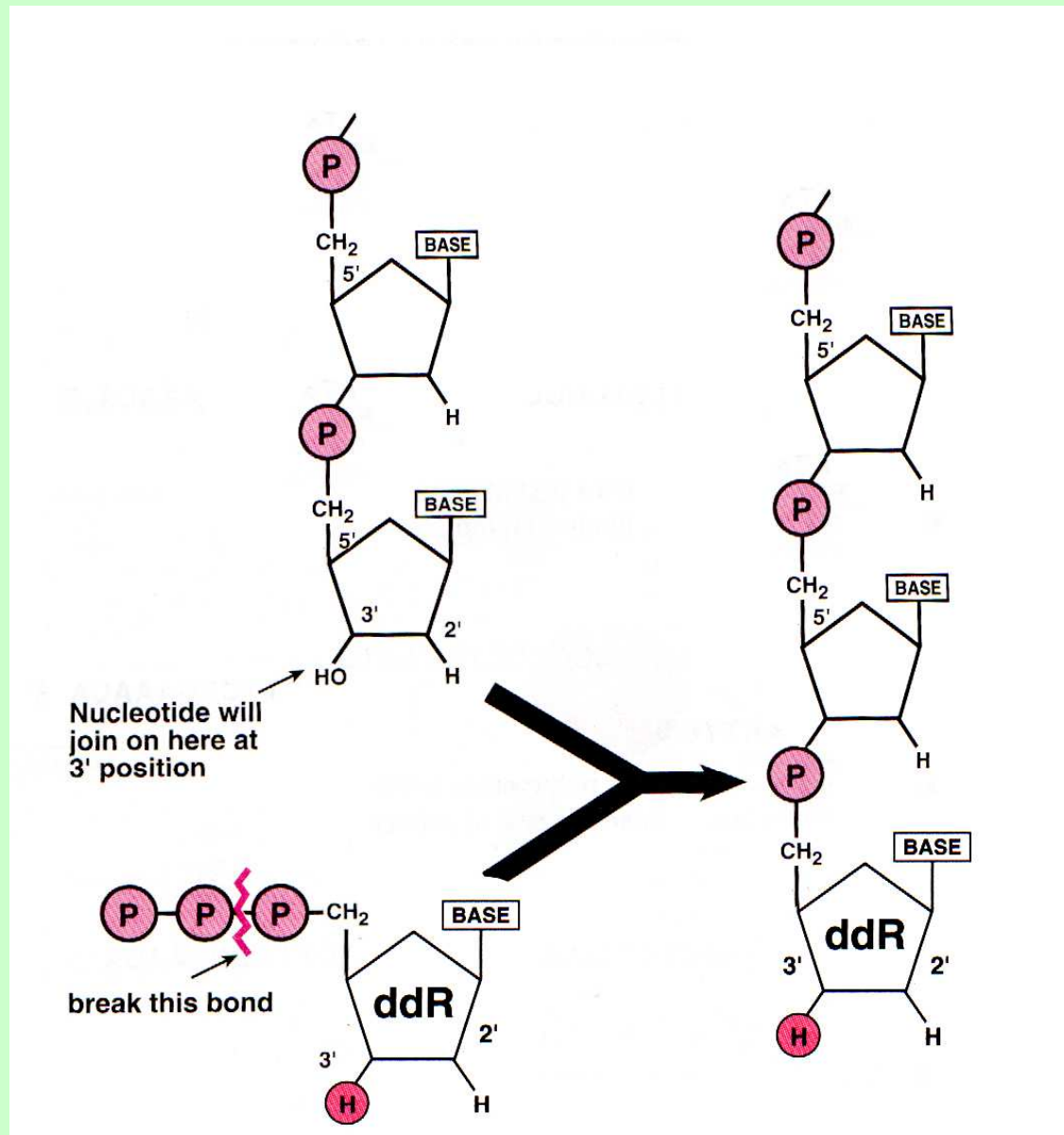
23.4 DEOXYNUCLEOSIDE TRIPHOSPHATE



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'

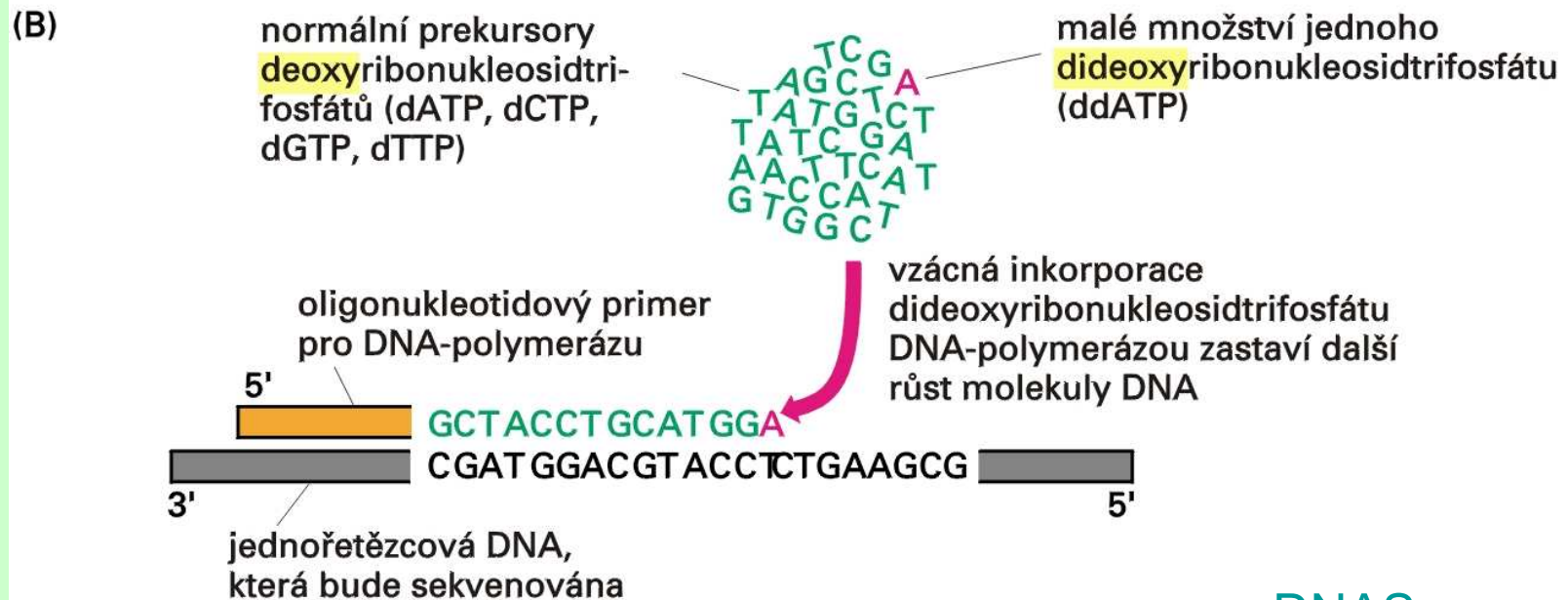
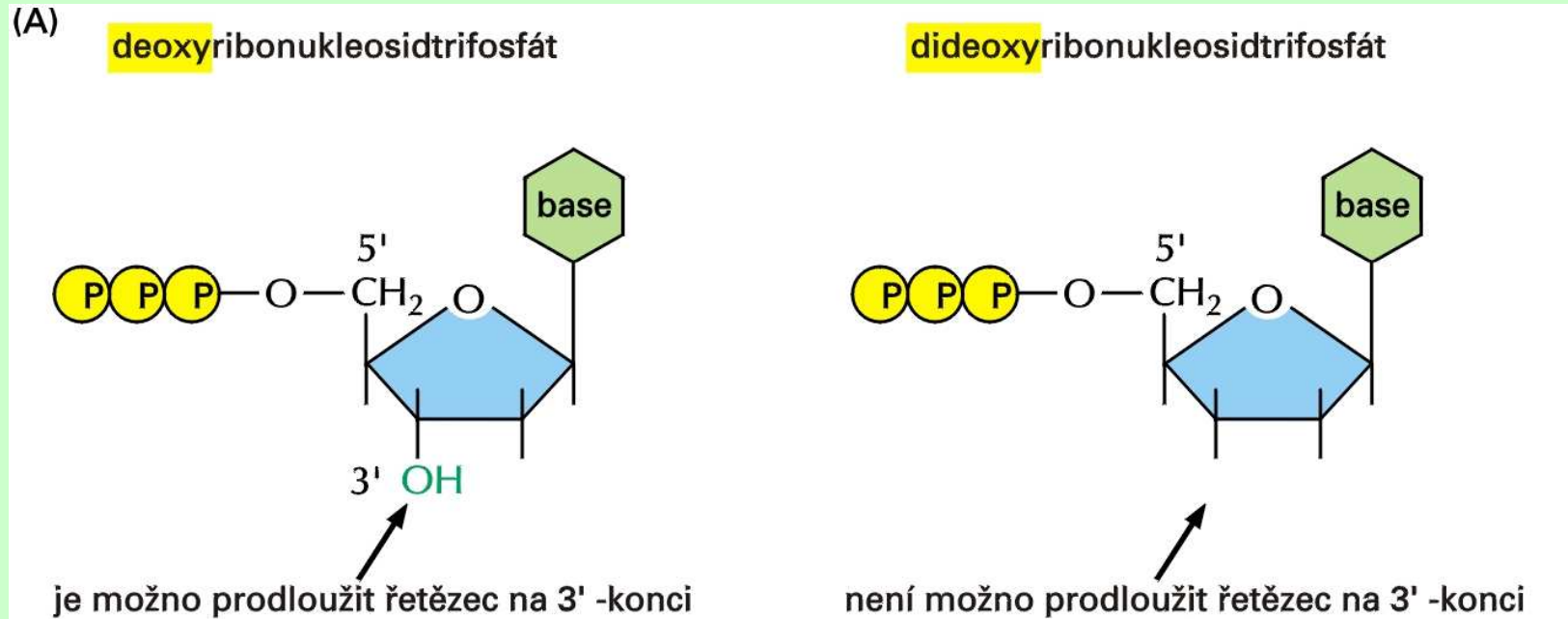
Perfektní kopie

~~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)



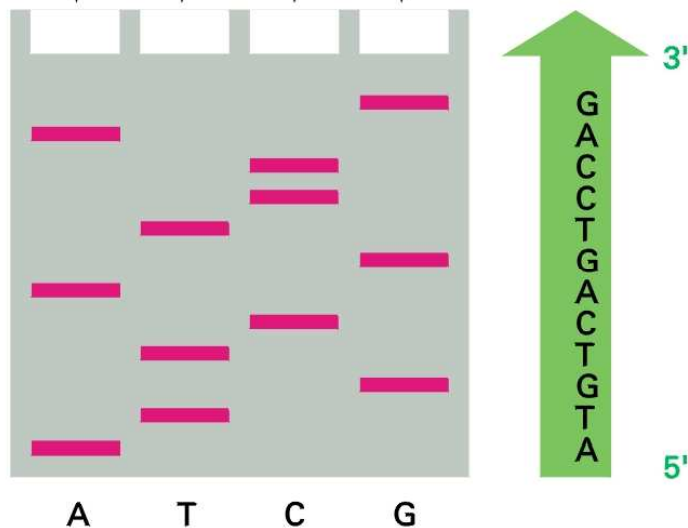
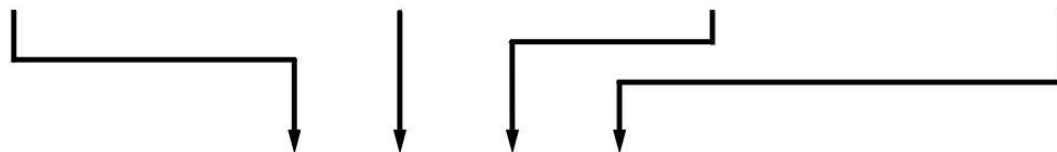
(C)

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

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

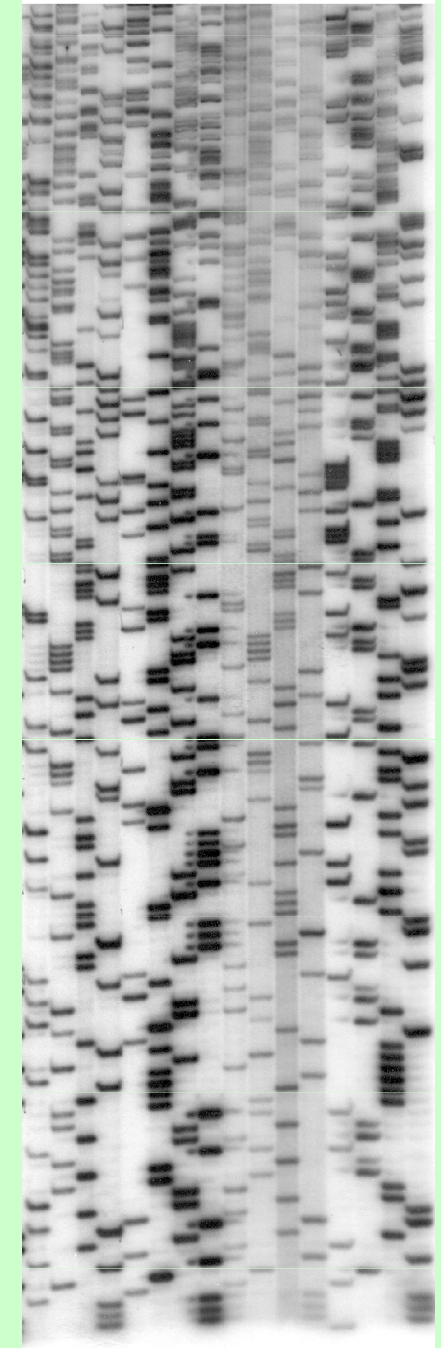
+ nadbytek dATP
dTTP
dCTP
dGTP

+ 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

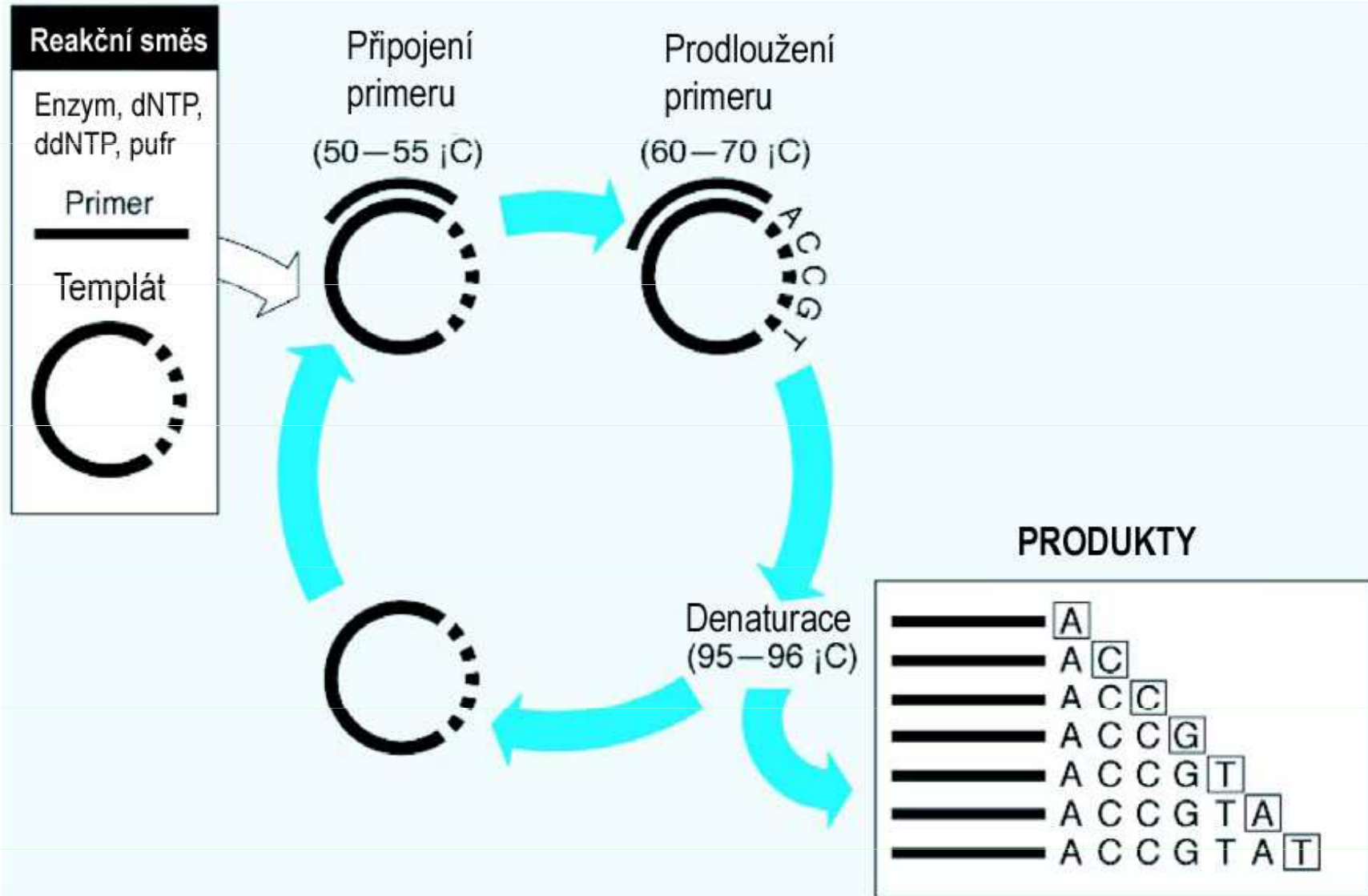


ATGC ATGC ATGC ATGC

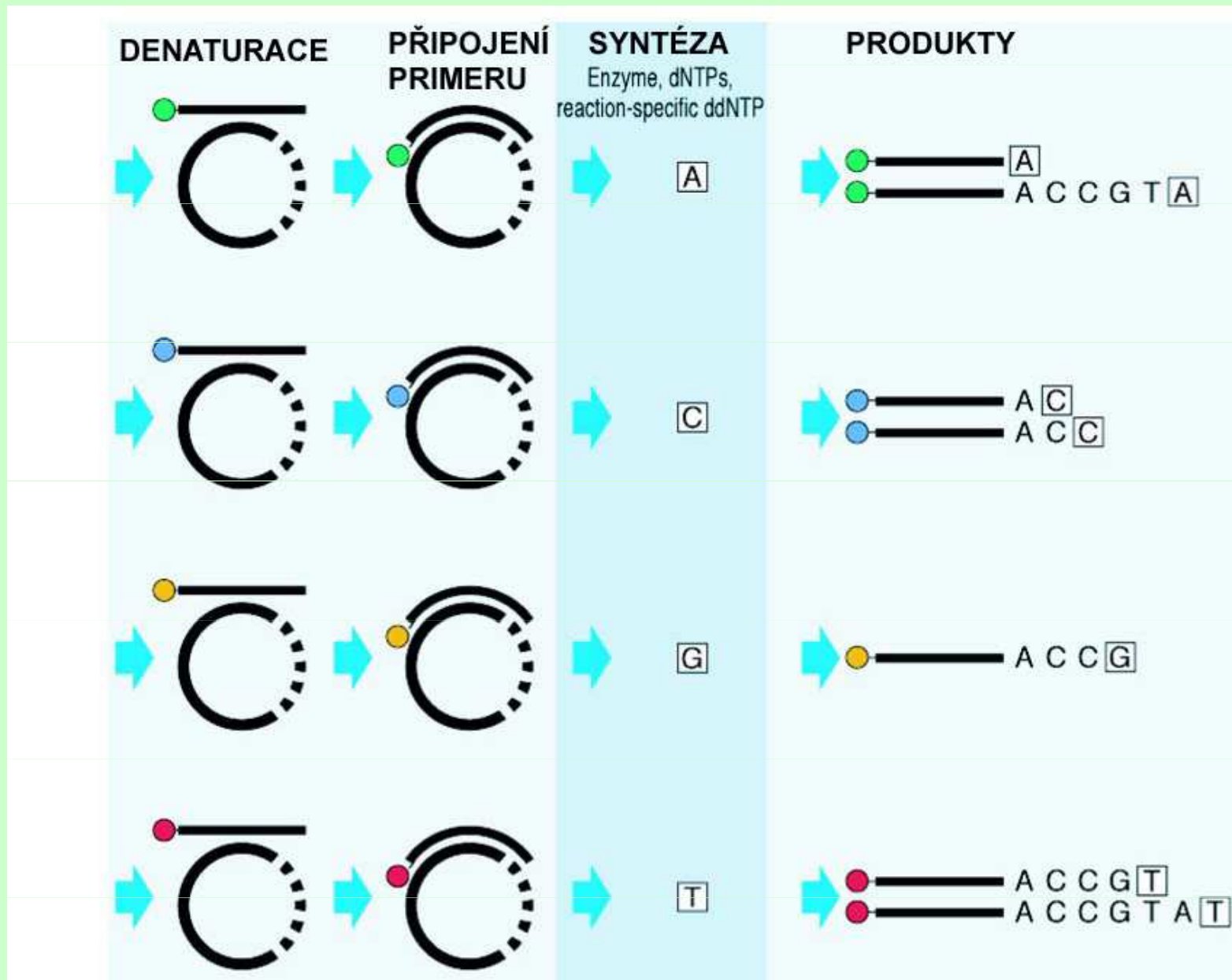
Automatické sekvencování DNA

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

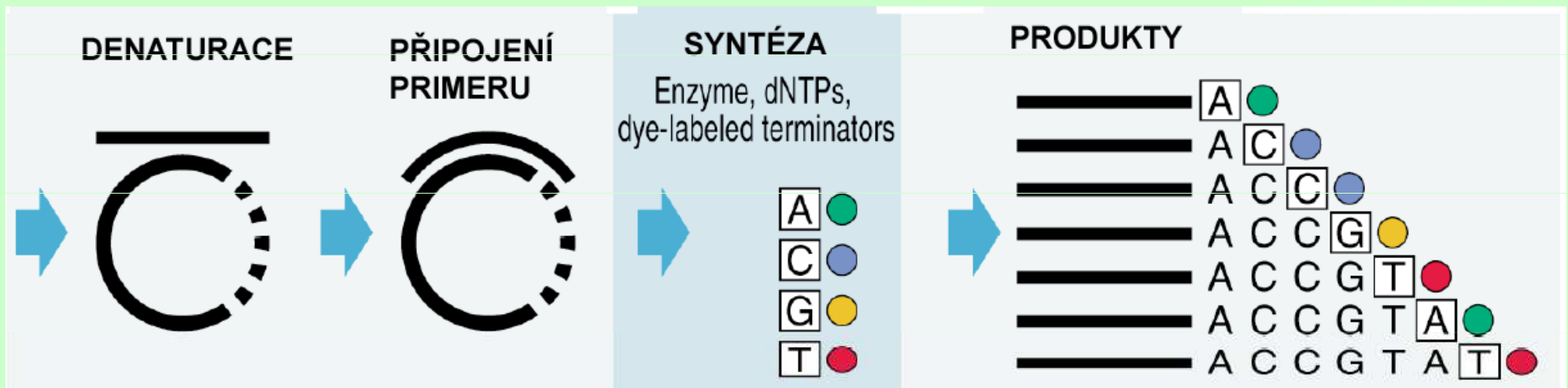
Asymetrická PCR pro sekvencování



Strategie barevných primerů

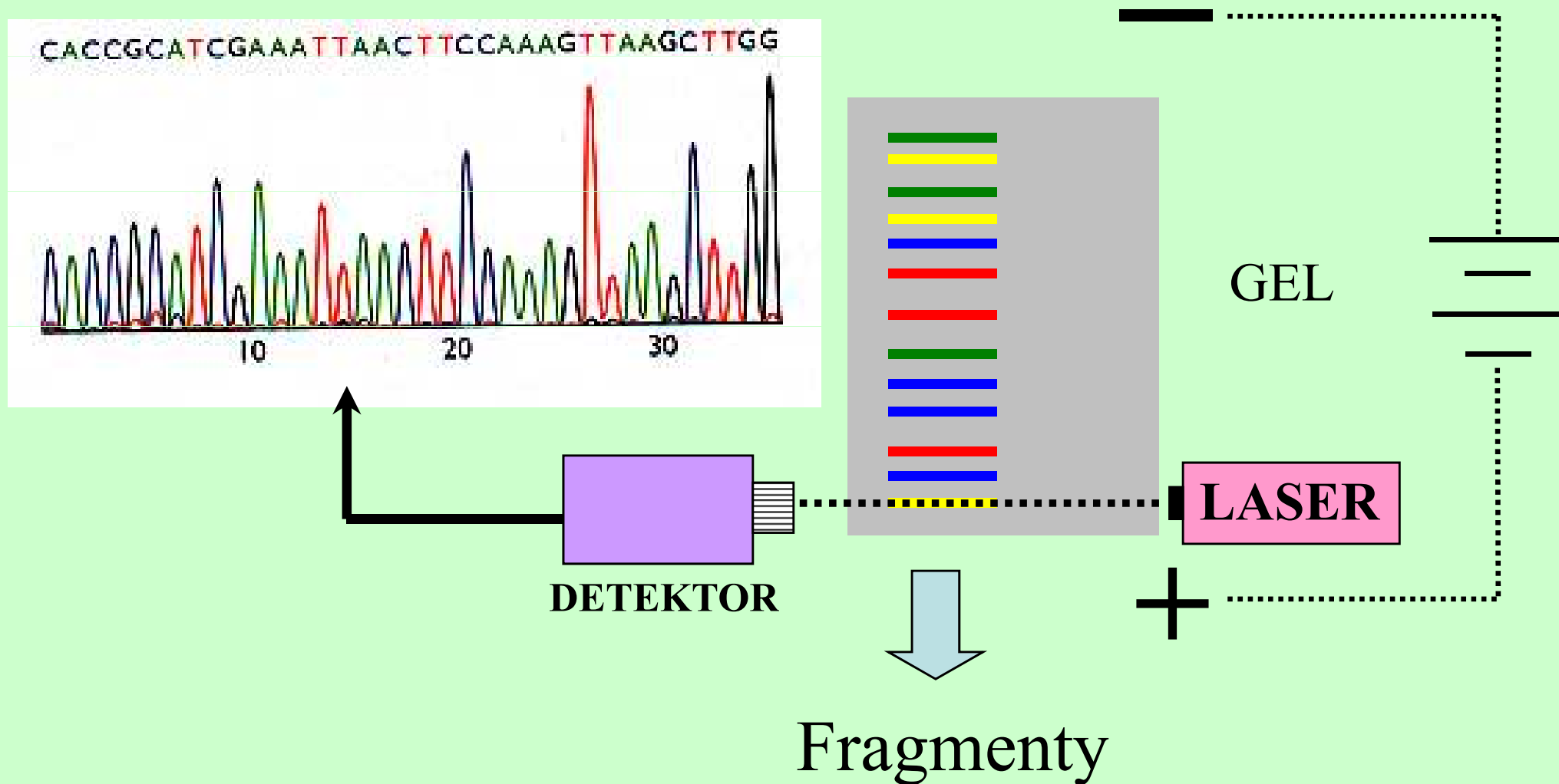


Strategie barevných terminátorů



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

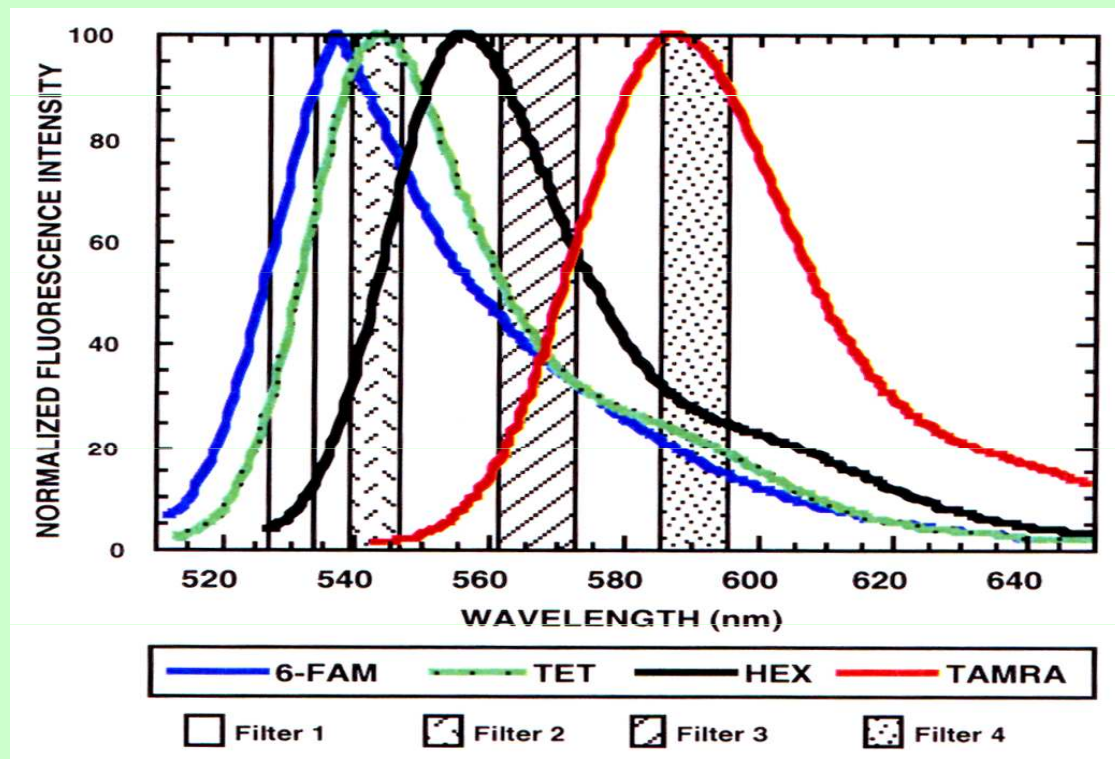
žebříček

C

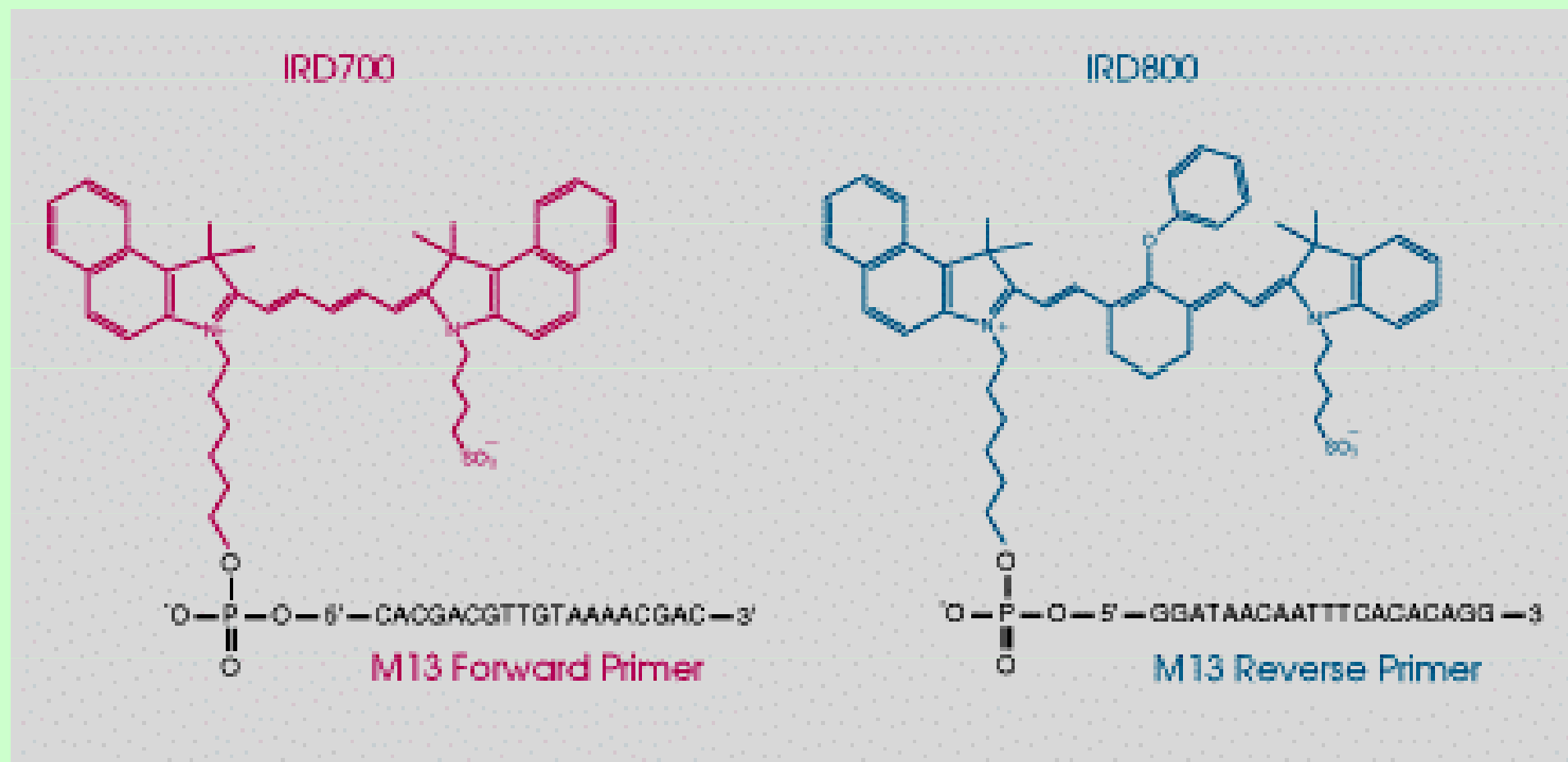
TAMRA

A

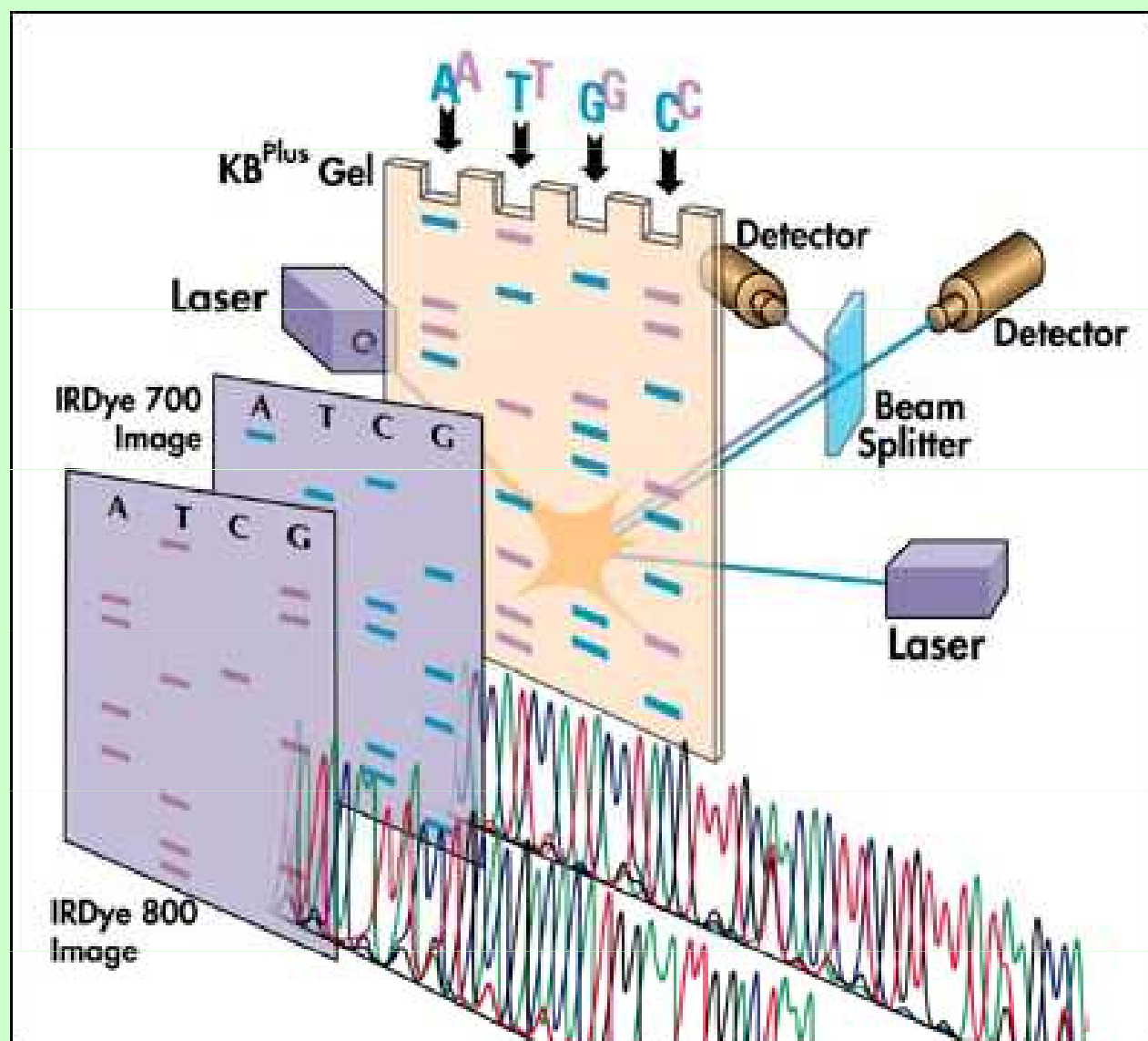
ROX



Příklad fluorescenčního značnického primeru



Vícenásobné detekce u různě značených primerů



Genetický analyzátor ABI 3100

Soustava
kapilár

Vyhřívaná deska



Příprava gelu

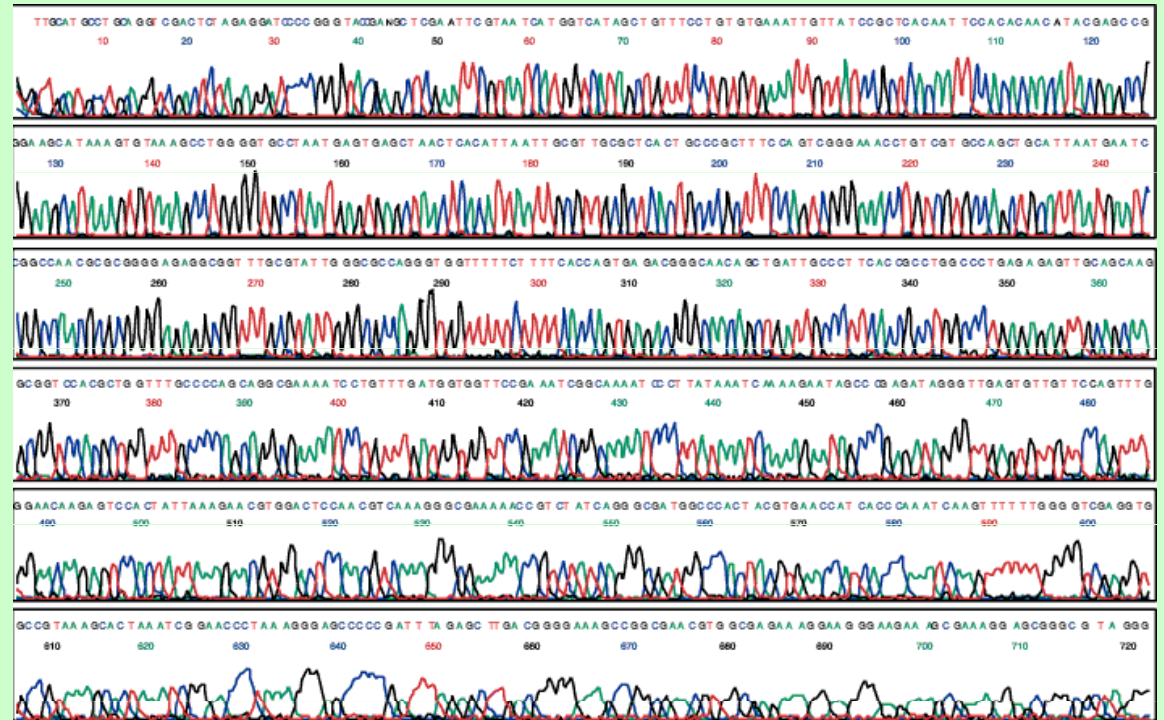
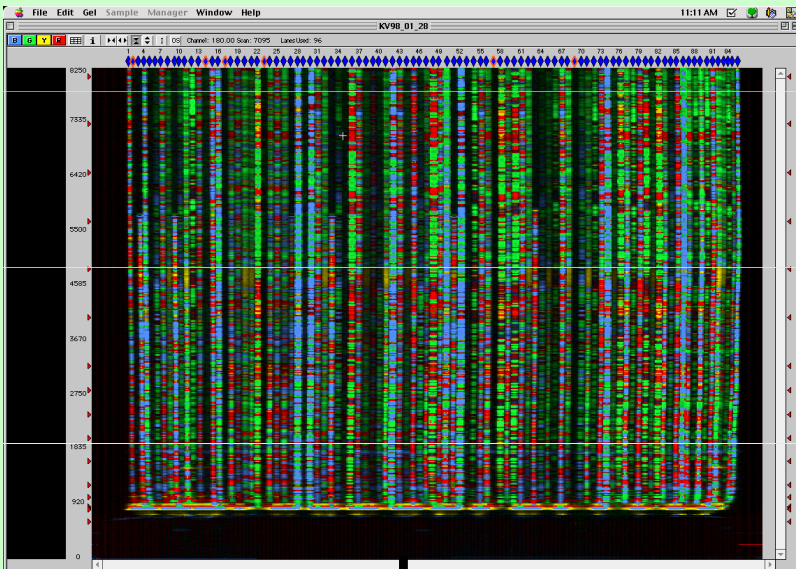
Laserový detektor

Rezervoár pufro

Automatické nanášení vzorku

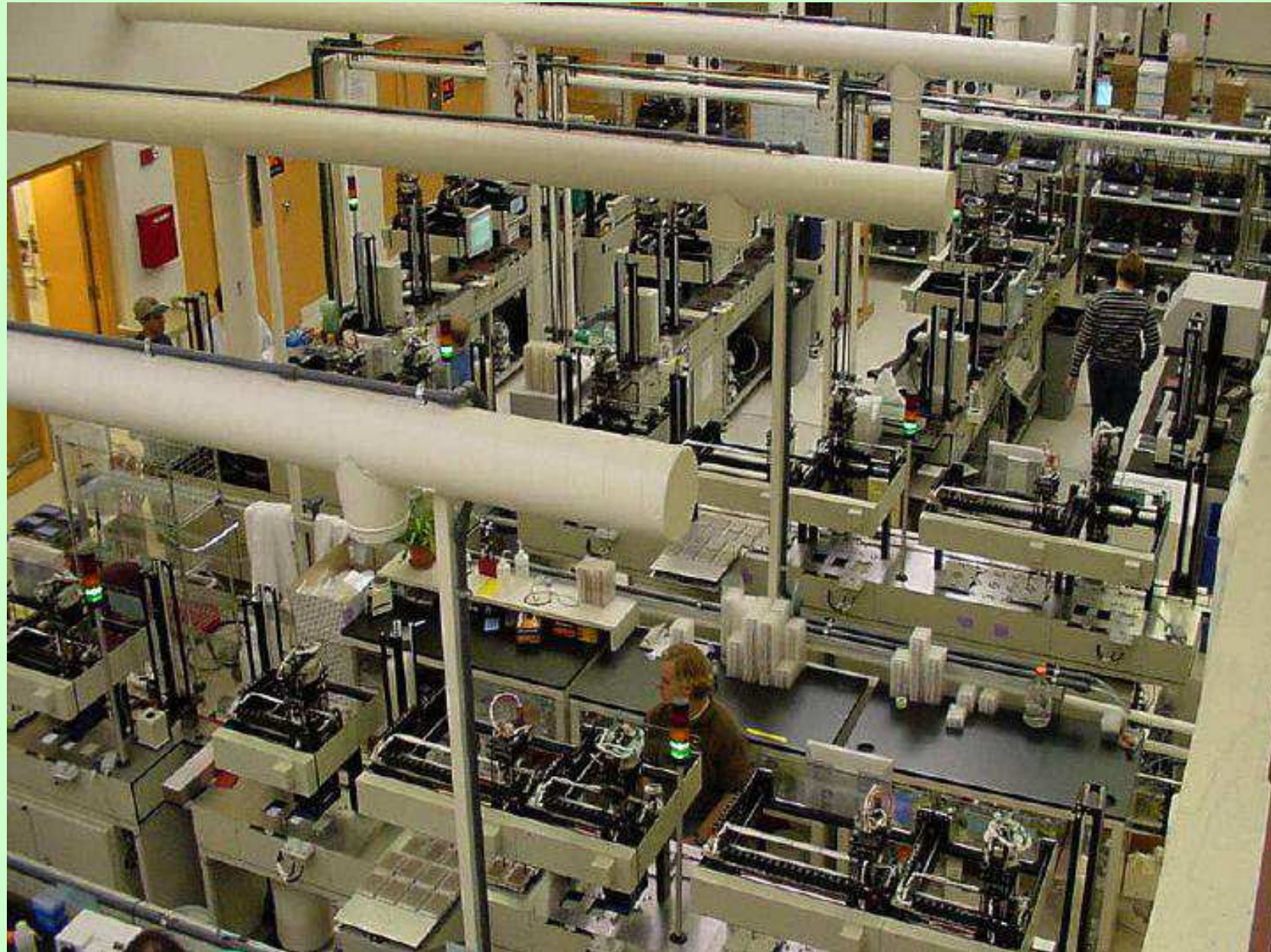


Příklad výstupu



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.

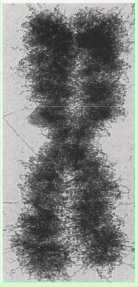
K tomuto účelu sekvencování genomů mohou být zvoleny dvě zcela odlišné strategie:

- 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

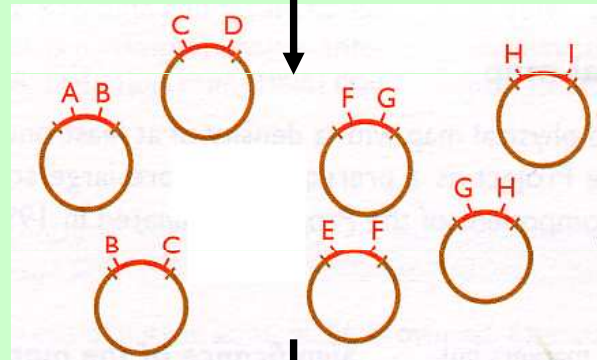


+



Vektor

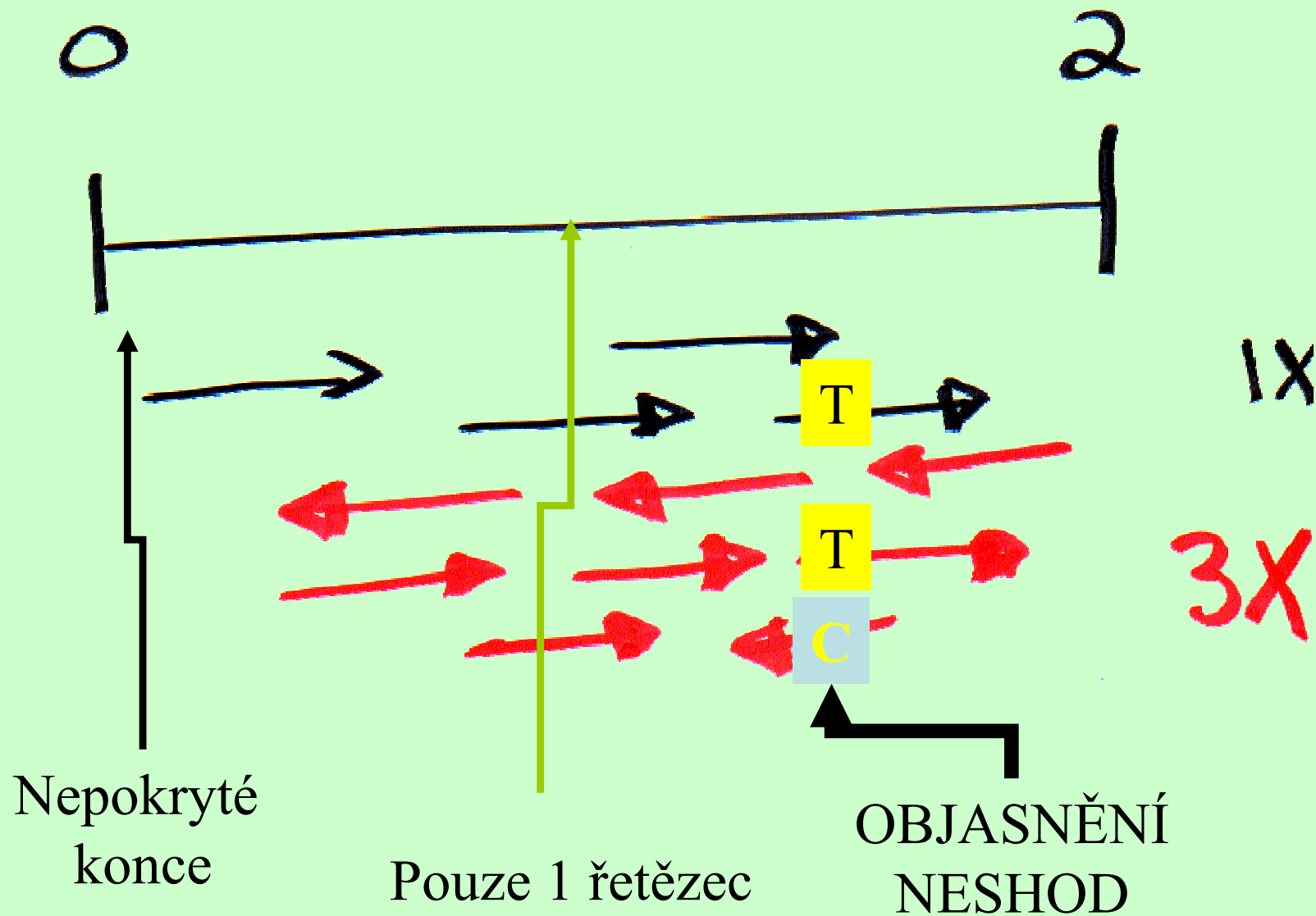
Úprava konců a klonování



Sestavení překrývajících se klonů



Náhodné sekvencování

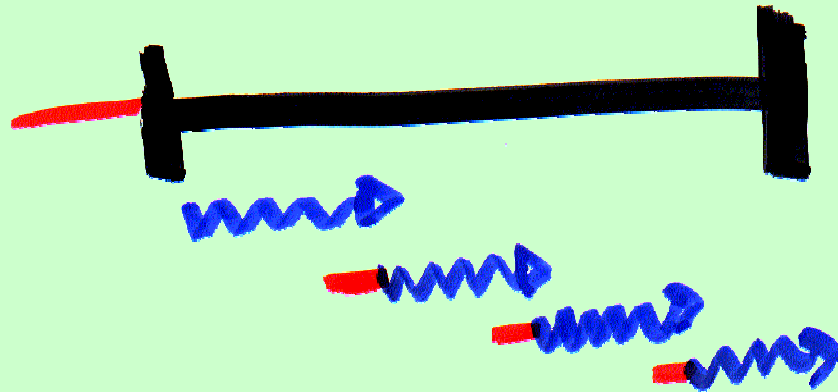


USPOŘÁDANÉ SEKVENCOVÁNÍ

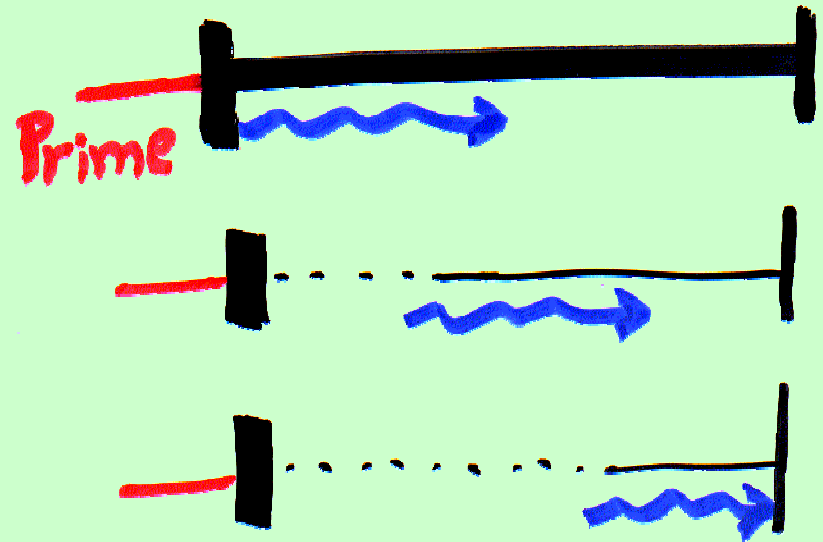
- Pro doplnění sekvence mezer zbývajících po náhodném sekvensování
- Pro sekvensování malých fragmentů DNA
- Dva odlišné přístupy:
 - **procházení primerem**
 - vyžaduje znalost sekvence, ke které se připojuje primer, který umožní prodloužení řetězce DNA-polymerázou.
 - získaná sekvence z první reakce 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 sekvensováním **obou řetězců**.
 - **postupné zkracování fragmentu exonukleázou a tvorba sousedících delecí**

Metody uspořádaného sekvencování

Procházení primerem

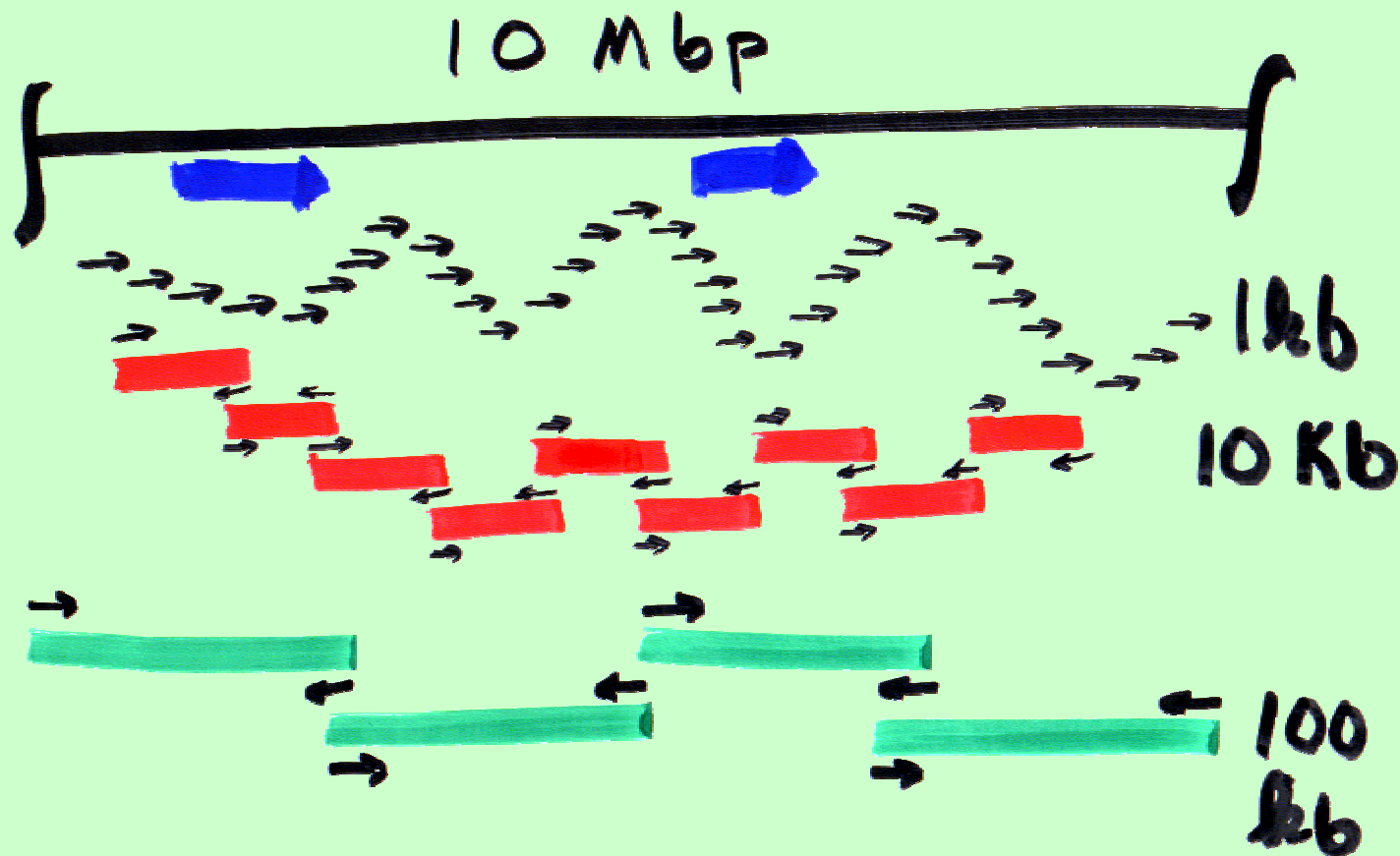


Sousední delece

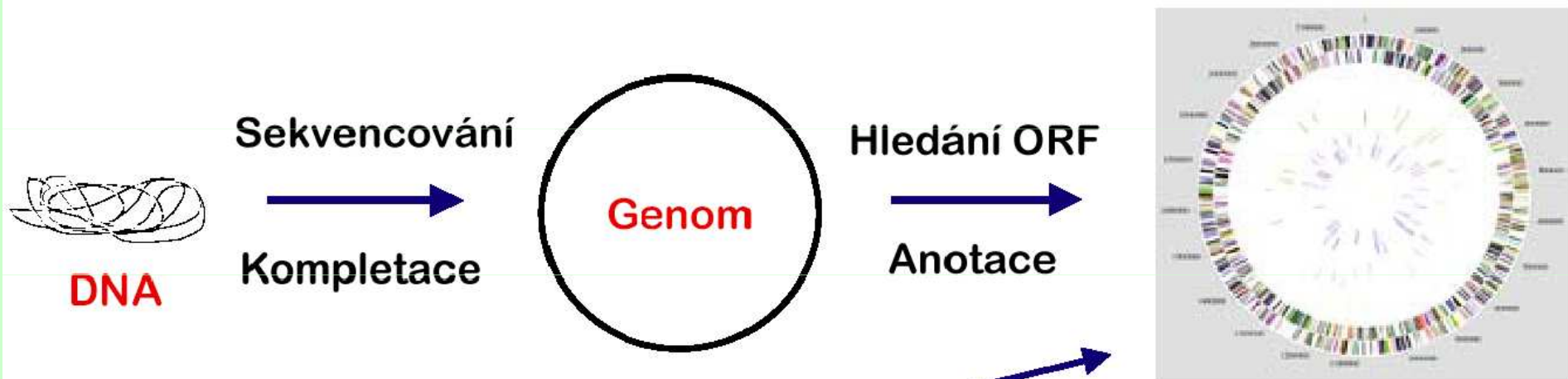


DOKONČENÍ PROJEKTU

- Sestavení kontigů

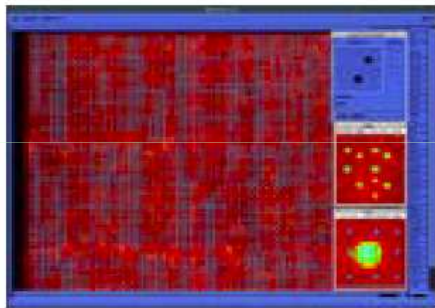


- Anotace (bioinformatika): ORF, repetice, regulační oblasti, → geny, → funkce



- **Transkriptom**

- Čipy

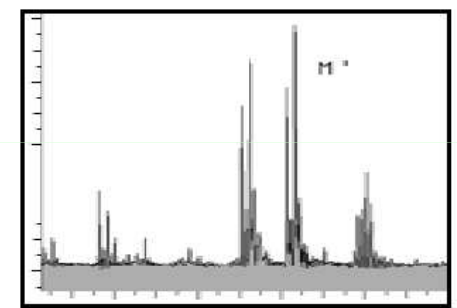


- **Proteom**

- 2D-Eelektroforéza



- MALDI-TOF-MS

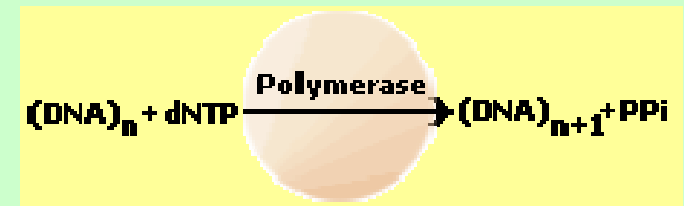


Alternativní přístupy pro stanovení sekvence DNA

- Pyrosekvencování
- Sekvencování prostřednictvím hybridizace

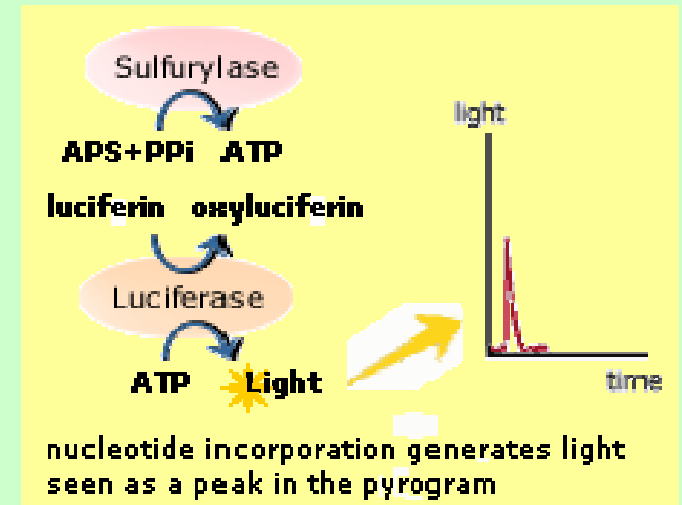
Pyrosekvencování

- 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, adenozin 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

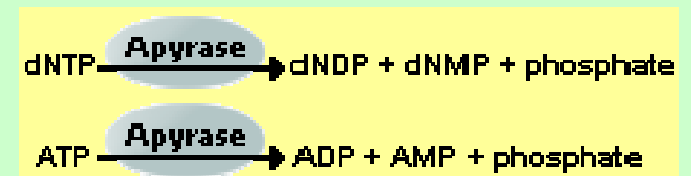


- 3. krok: ATP sulfuryláza kvantitativně přeměňuje PPI na ATP za přítomnosti APS

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

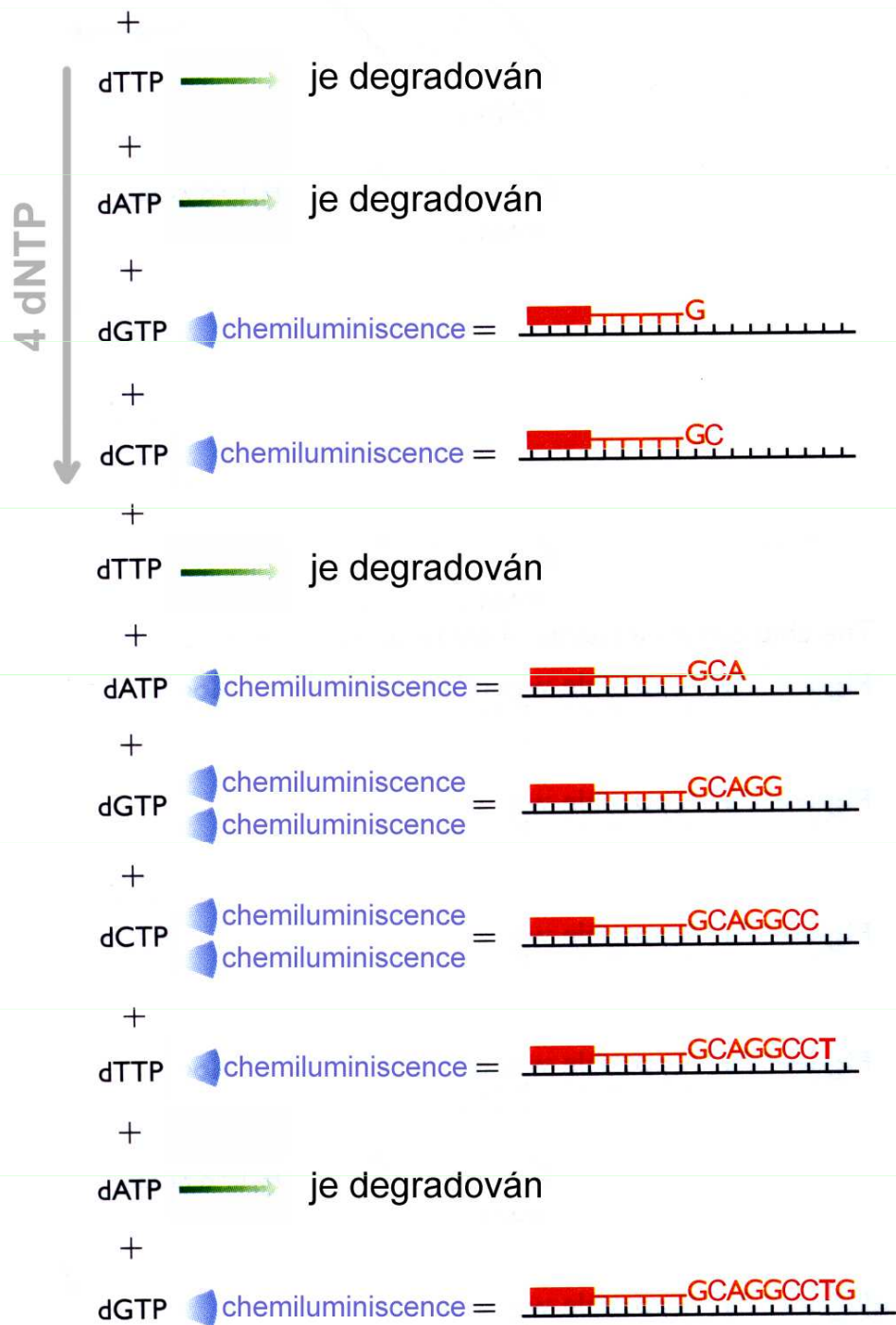


- 4. krok: Apyráza degraduje nepřípojené dNTP a nespotřebované ATP



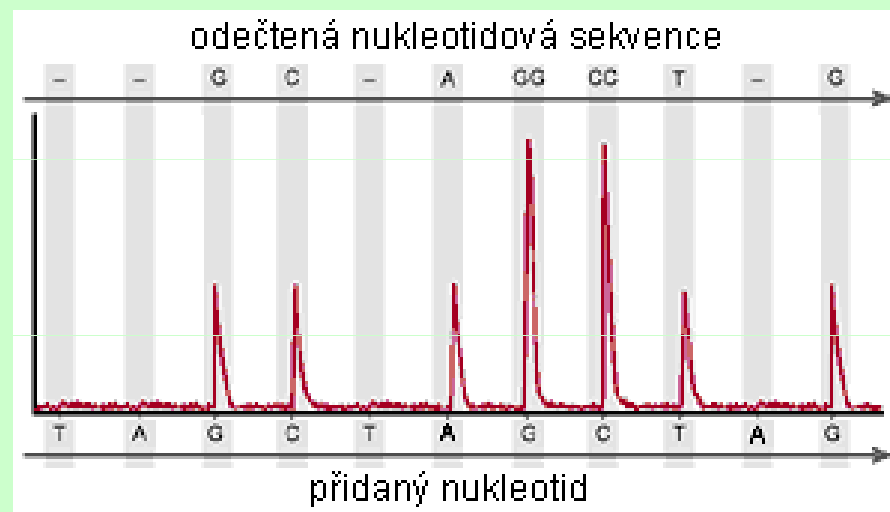
- Až je degradace kompletní je přidán další dNTP, který je v pořadí
- Proces se znovu opakuje a sekvence je odečítána z pyrogramu
- Namísto standardního dATP je používán α -thiosubstituovaný dATP, který je přijímán DNA polymerázou, ale nikoli luciferázou
- Metoda je ve vývoji a je používána pro identifikaci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

primer templátová DNA



Princip pyrosekvencování

pyrogram



Pyrosekvencování

Výhody

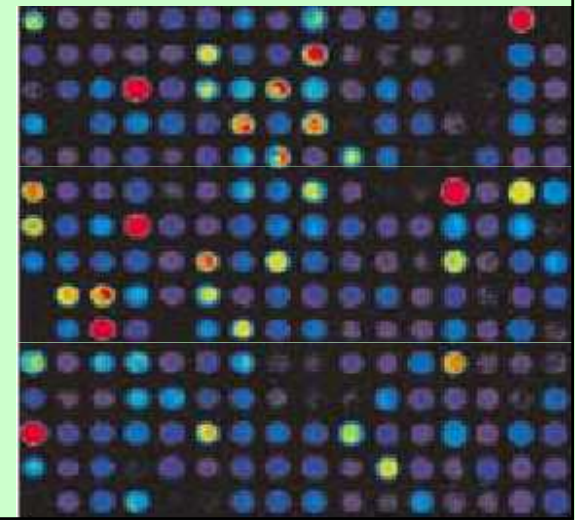
- Vysoká přesnost
- Flexibilita a možnost paralelního zpracování velkého množství vzorků
- Snadná automatizace
- Nevyžaduje elektroforézu a značené primery

Nevýhody

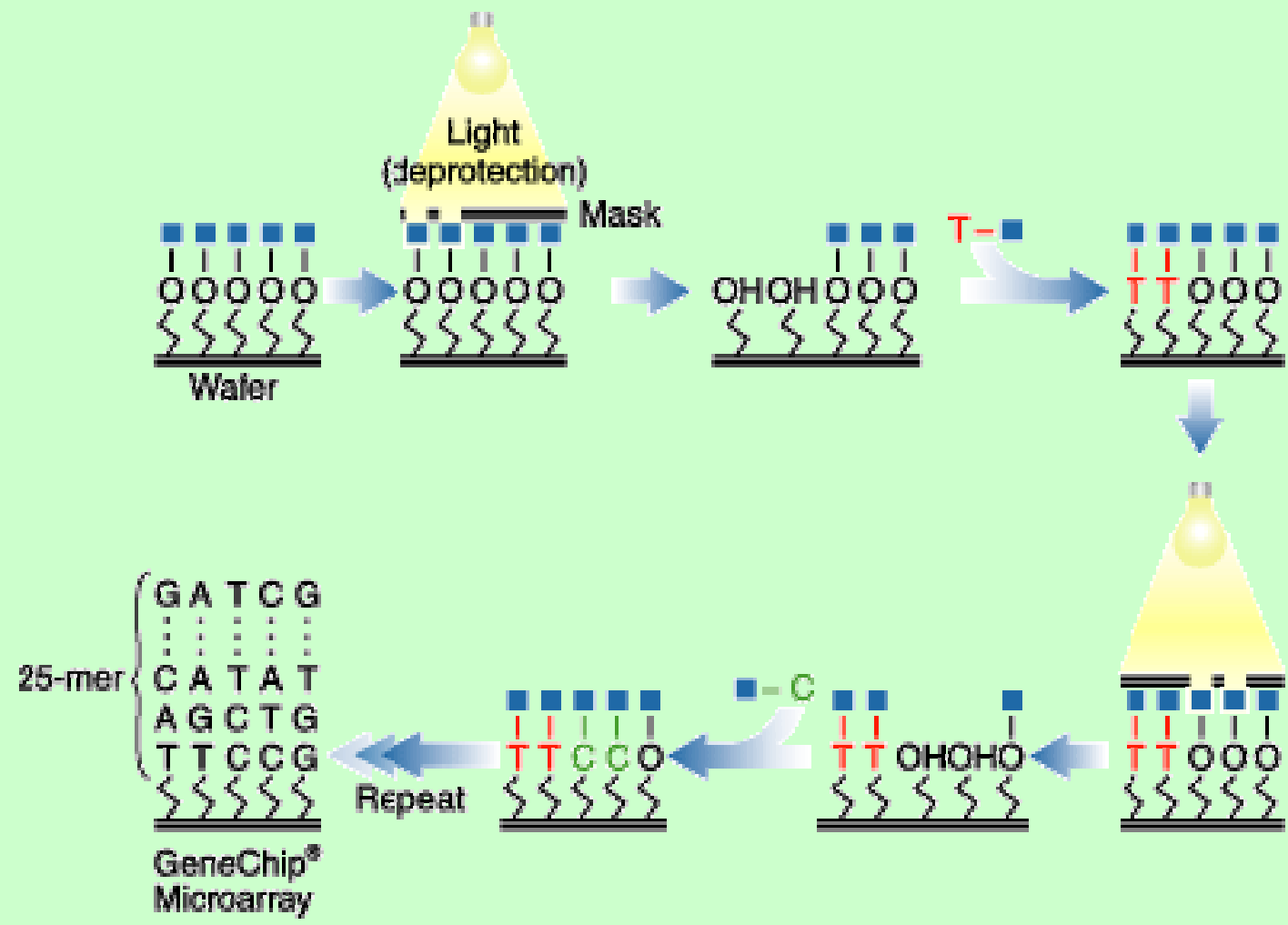
- Rychlost pyrosekvencování je cca 1 odečtená báze/min.
- Běžná délka stanovené sekvence je cca 100 bp

DNA čipy (microarrays) pro hybridizační analýzu

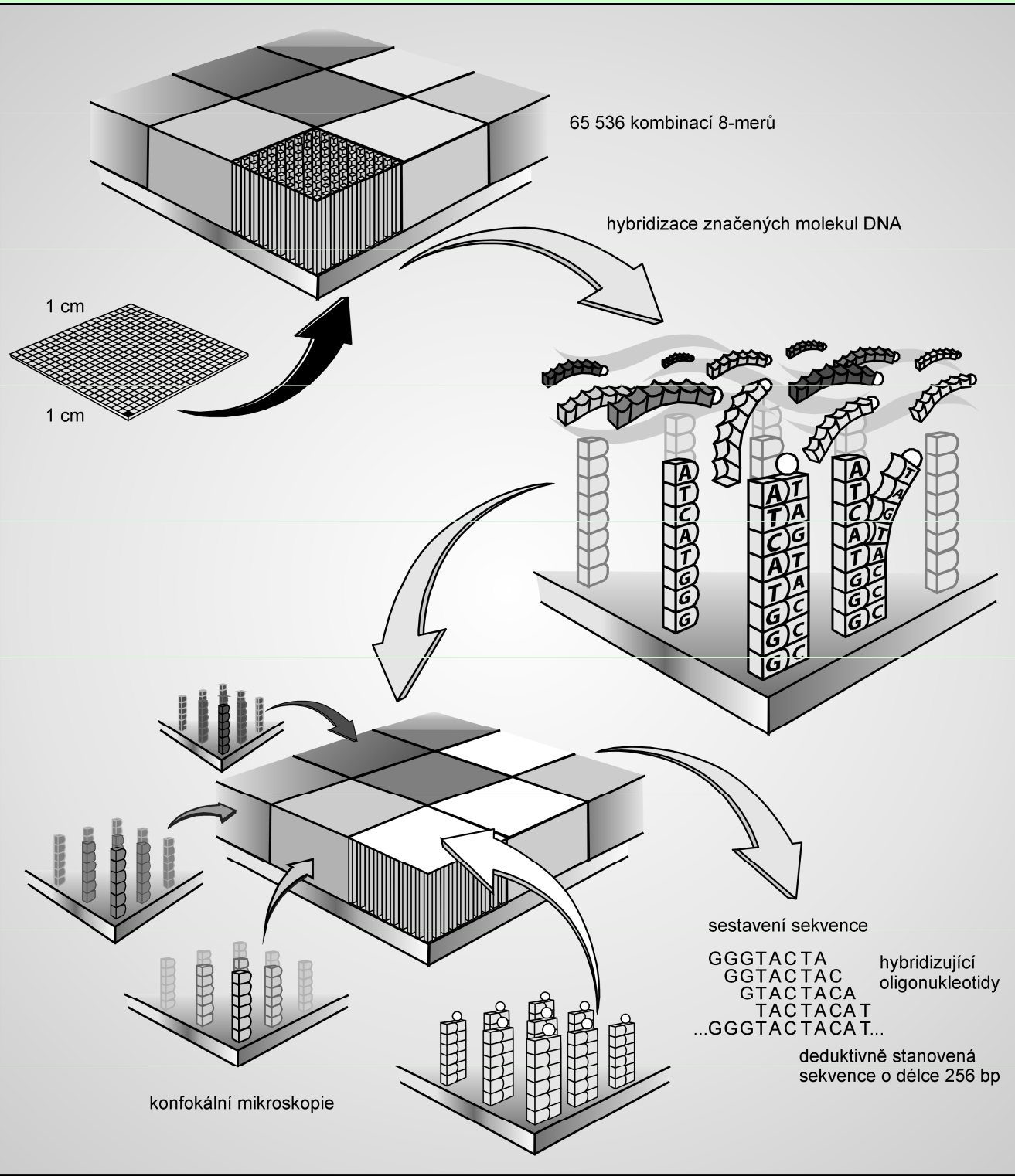
- DNA čipy slouží k paralelnímu provádění DNA hybridizace testované DNA s velkým počtem (desetitisíce) sond.
- Jejich hlavní aplikací je vyhledávání polymorfizmů, např. SNP, nebo srovnávání vzorků RNA izolovaných z různých buněk.
- DNA čip je malá destička nesoucí velký počet sond DNA, které se vzájemně 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).



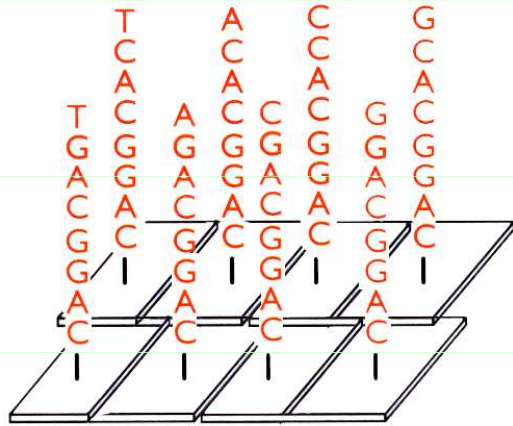
- Prakticky se při práci s DNA čipy postupuje tak, že je čip inkubován se značenou cílovou DNA za podmínek, umožňujících hybridizaci k sondě.
- Poloha oligonukleotidové sondy, k níž se hybridizuje testovaná DNA, se stanoví detekováním emitované fluorescence na povrchu čipu pomocí konfokálního mikroskopu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



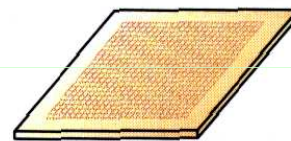
Čipy pro sekvencování pomocí hybridizace (SBH)

- 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

Princip SBH - stanovení sekvence *de novo*



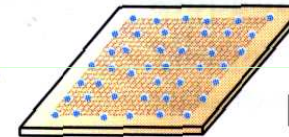
65 563 kombinací 8-merů



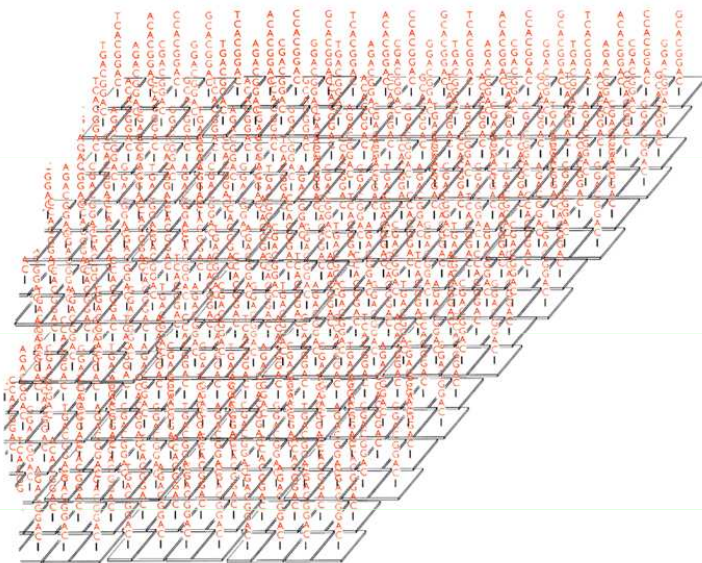
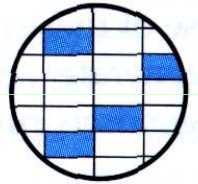
DNA čip



Hybridizace



Konfokální
mikroskopie



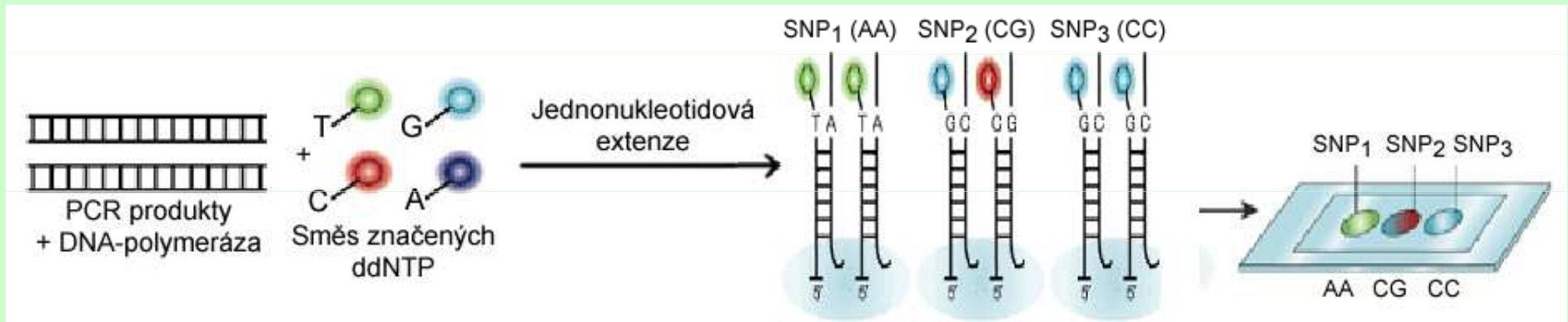
ATAGGCAT
TAGGCATA
AGGCATAA
GGCATAAG
...ATAGGCATAAG...

Hybridizující
oligonukleotidy
Deduktivně stanovená
sekvence DNA

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.

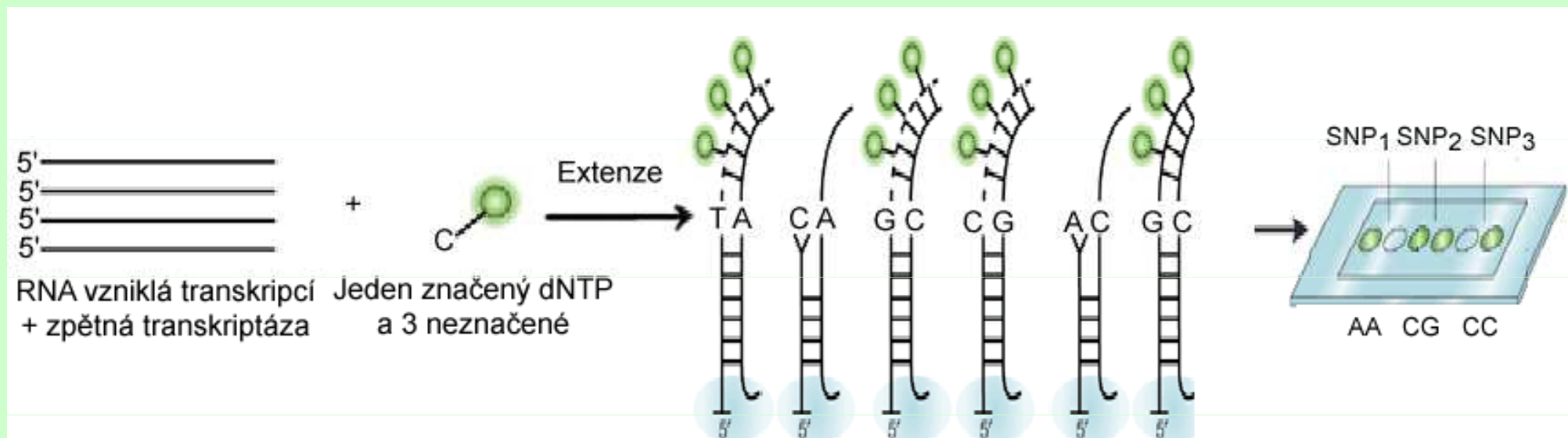
Stanovení SNP pomocí DNA čipu



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.

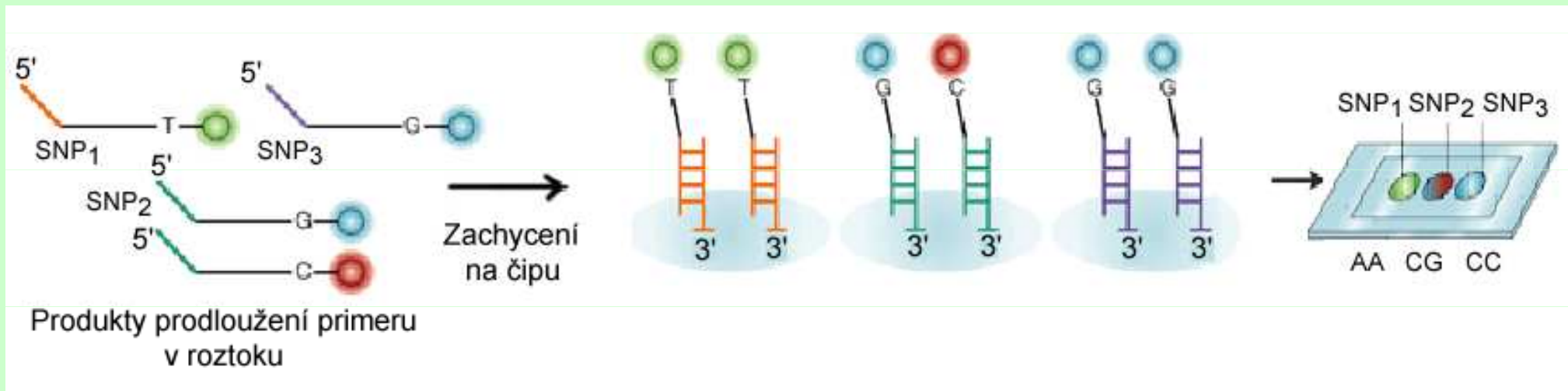
Stanovení SNP pomocí DNA čipu



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 sekvencí (tag).
- DNA-čip, který je komplementární k přídatným sekvencím primerů (tag array) je potom použit pro zachycení produktů cyklické minisekvenační reakce.