

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 koncově značené molekuly DNA, která se chemicky degraduje v místech, kde se vyskytuje báze určitého typu na fragmenty.

Ty se následně oddělují elektroforézou.

Enzymatická metoda (Sanger)

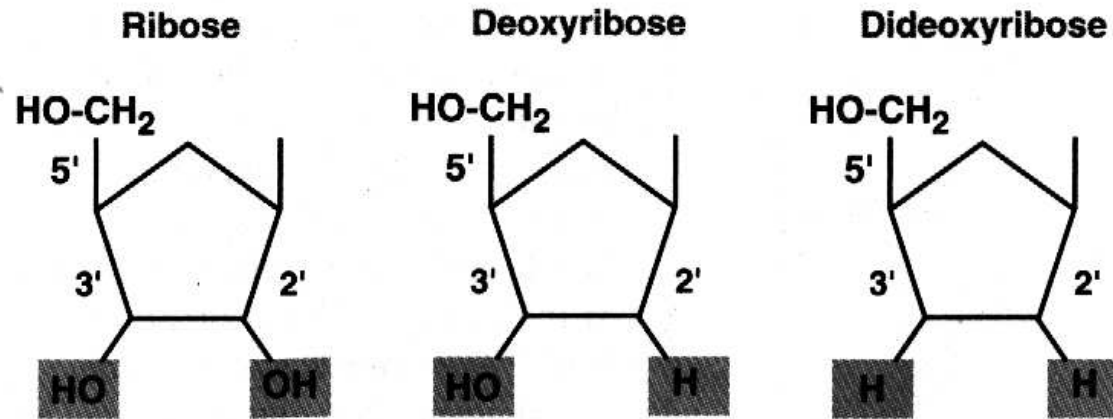
1. Příprava ssDNA jejíž sekvence má být stanovena
2. Rozdělení do 4 vzorků
3. Reakce s DNA polymerázou při níž se začlení do syntetizované DNA místo normálního deoxyribonukleosidtrifosfátu jeho analog, který působí jako koncový inhibitor syntézy DNA - dideoxynukleosidtrifosfát (ddNTP).
V každém ze 4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

Reakce obsahuje:

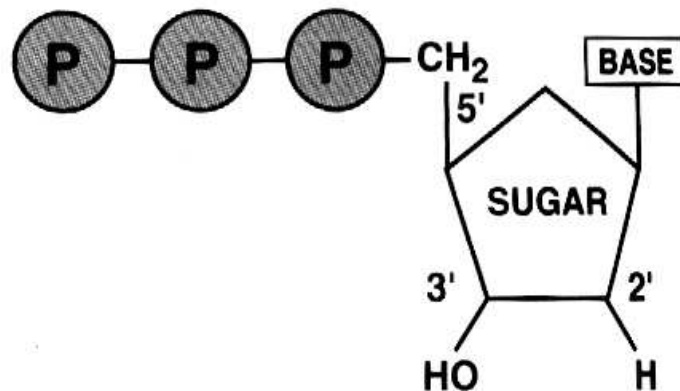
- molekulu DNA
- značený primer při pojující se k části molekuly DNA (místo odkud začínáme stanovovat sekvenci)
- směs obsahující 4 normální nukleotidy
- jeden ddNTP (v každém ze 4 vzorků je jiný)
- DNA polymerázu

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

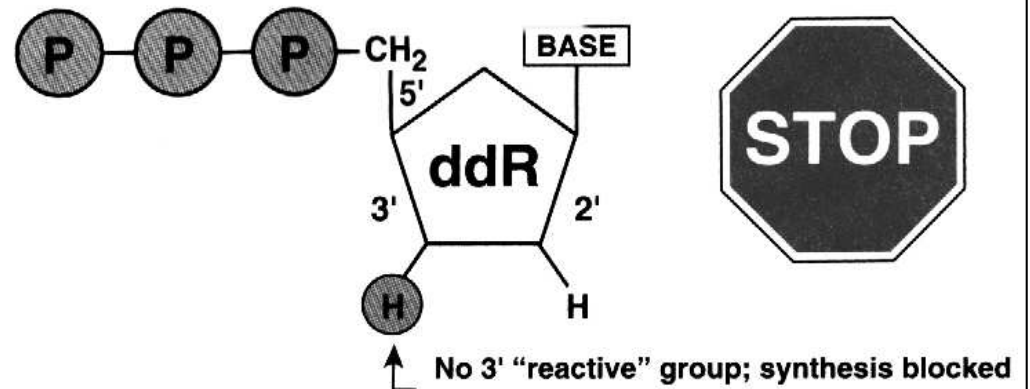
Dideoxynukleotidy nemají hydroxyl na 3'-konci



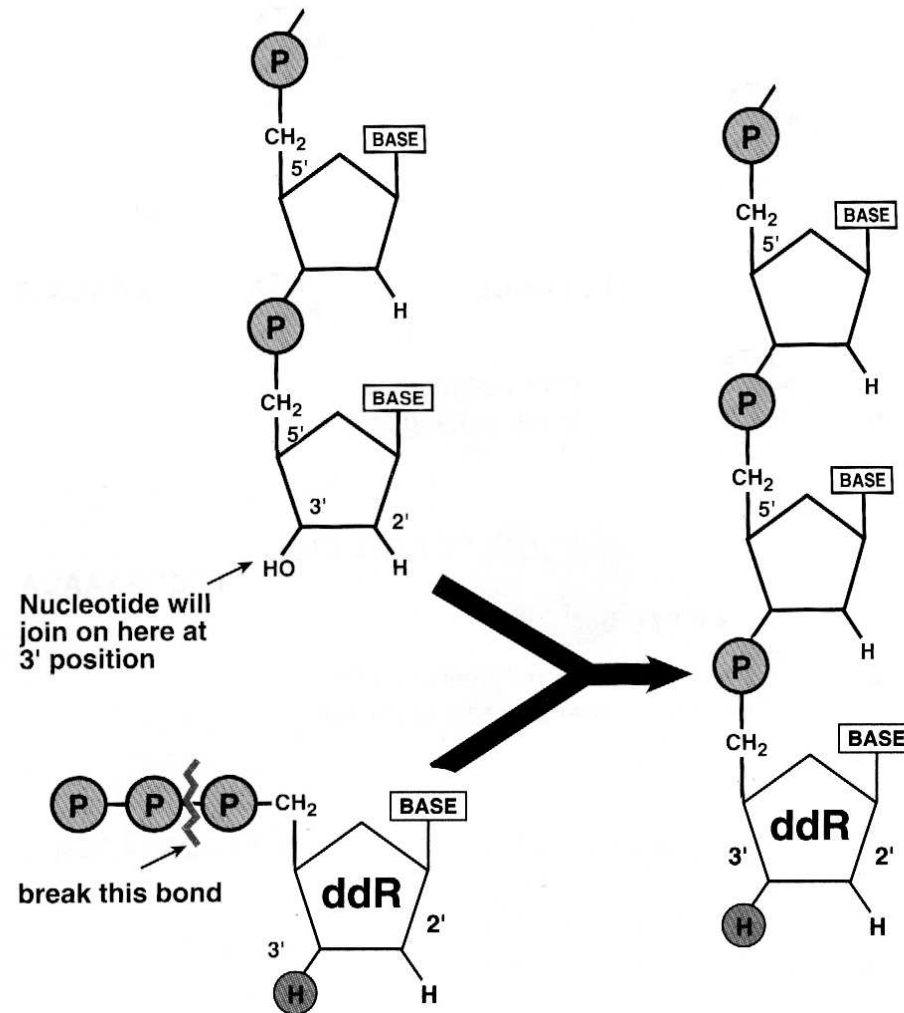
23.4 DEOXYNUCLEOSIDE TRIPHOSPHATE



23.7 DIDEOXYRIBOSE BLOCKS ELONGATION



Pokud je
dideoxynukleotid
inkorporován do
syntetizujícího se
řetězce, působí
jako **terminátor**
syntézy DNA



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

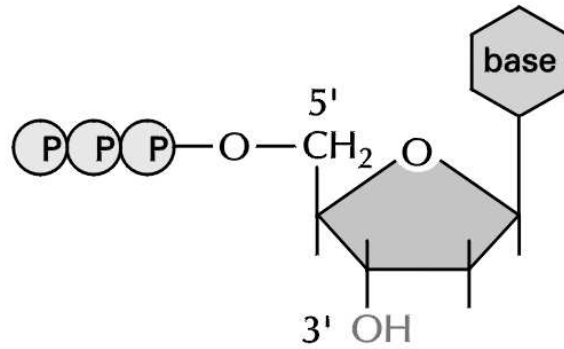
T C G G A C C G C T G G T A G

Enzymová metoda sekvencování DNA (Sanger)

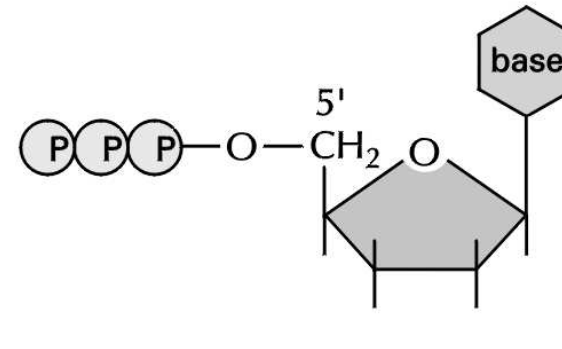
(A)

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
TATGCT
TATCGAT
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

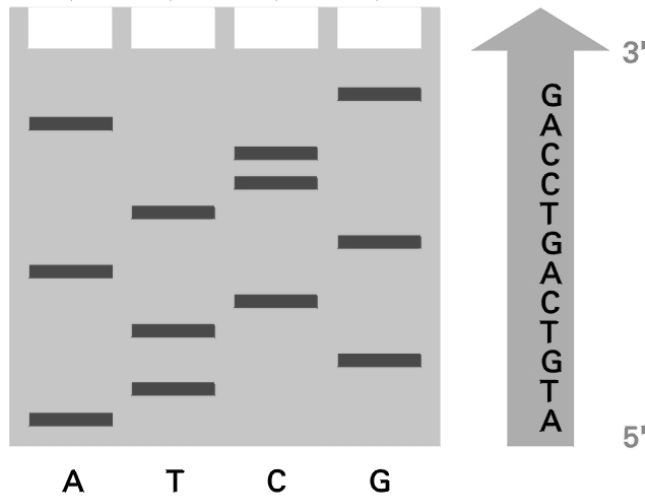
označený primer ↓
5' GCAT 3'

3' CGTATACAGTCAGGTC 5' } jednořetězcová DNA

+ nadbytek dATP
dTTP
dCTP
dGTP

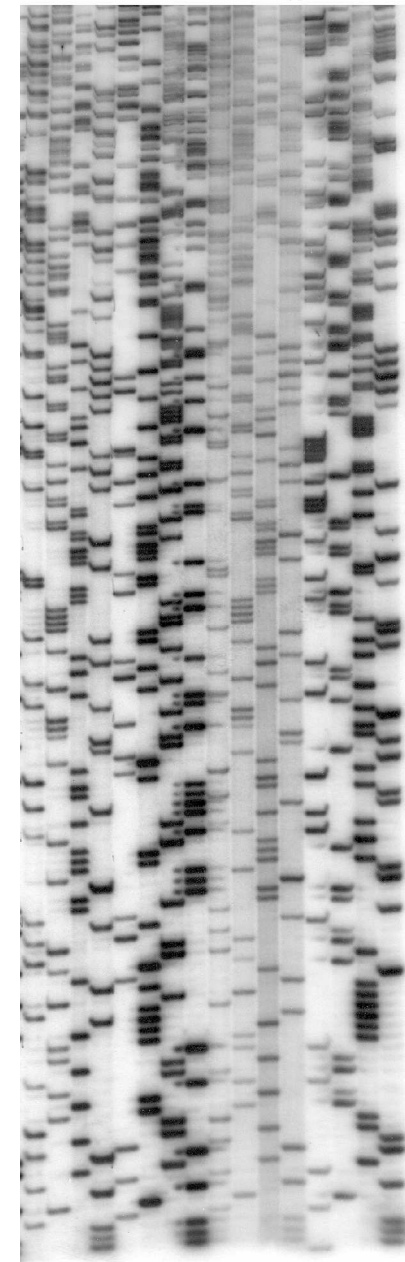
+ ddATP + DNA-polymeráza + ddTTP + DNA-polymeráza + ddCTP + DNA-polymeráza + ddGTP + DNA-polymeráza

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

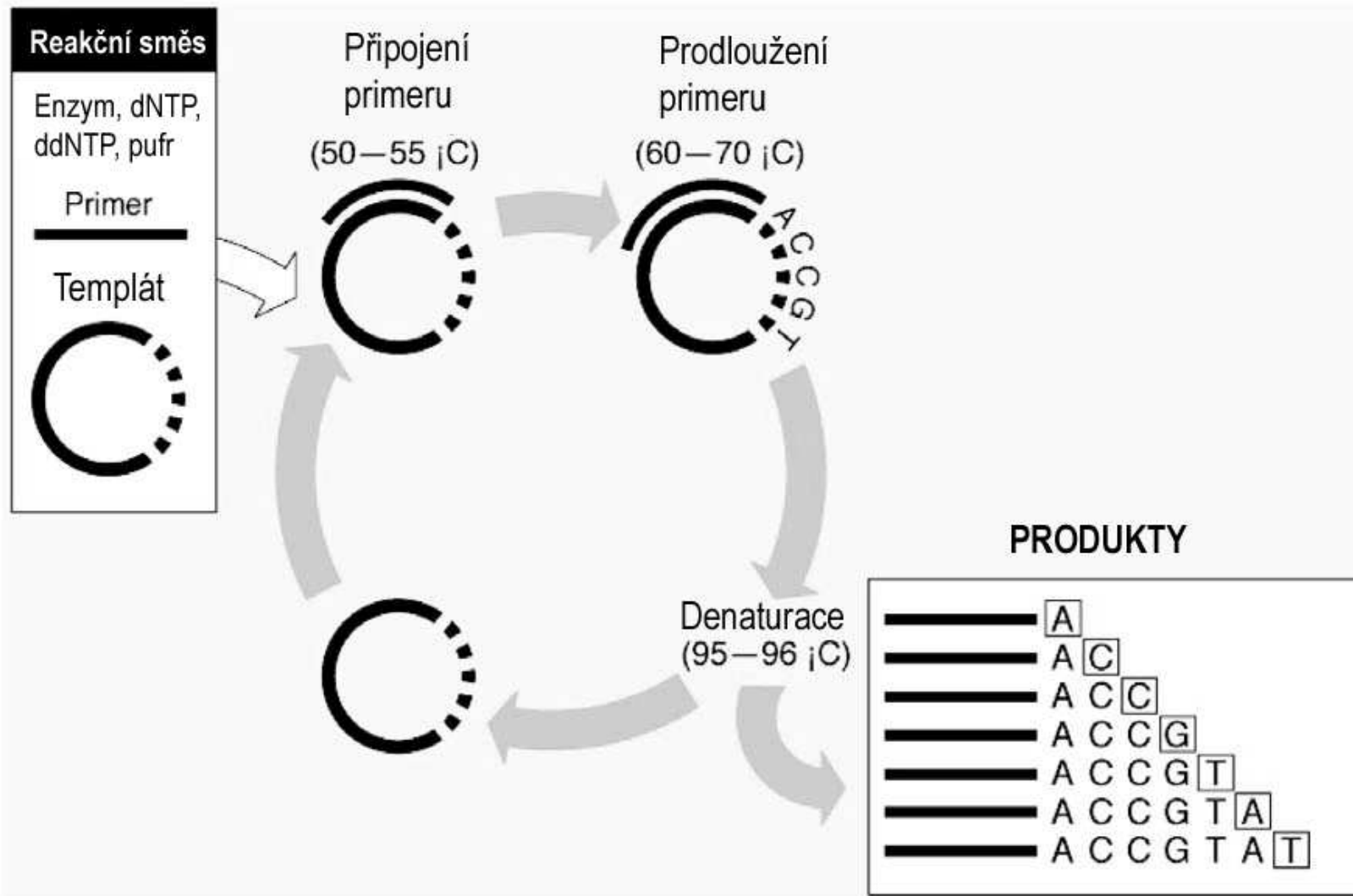


ATGC ATGC ATGC ATGC

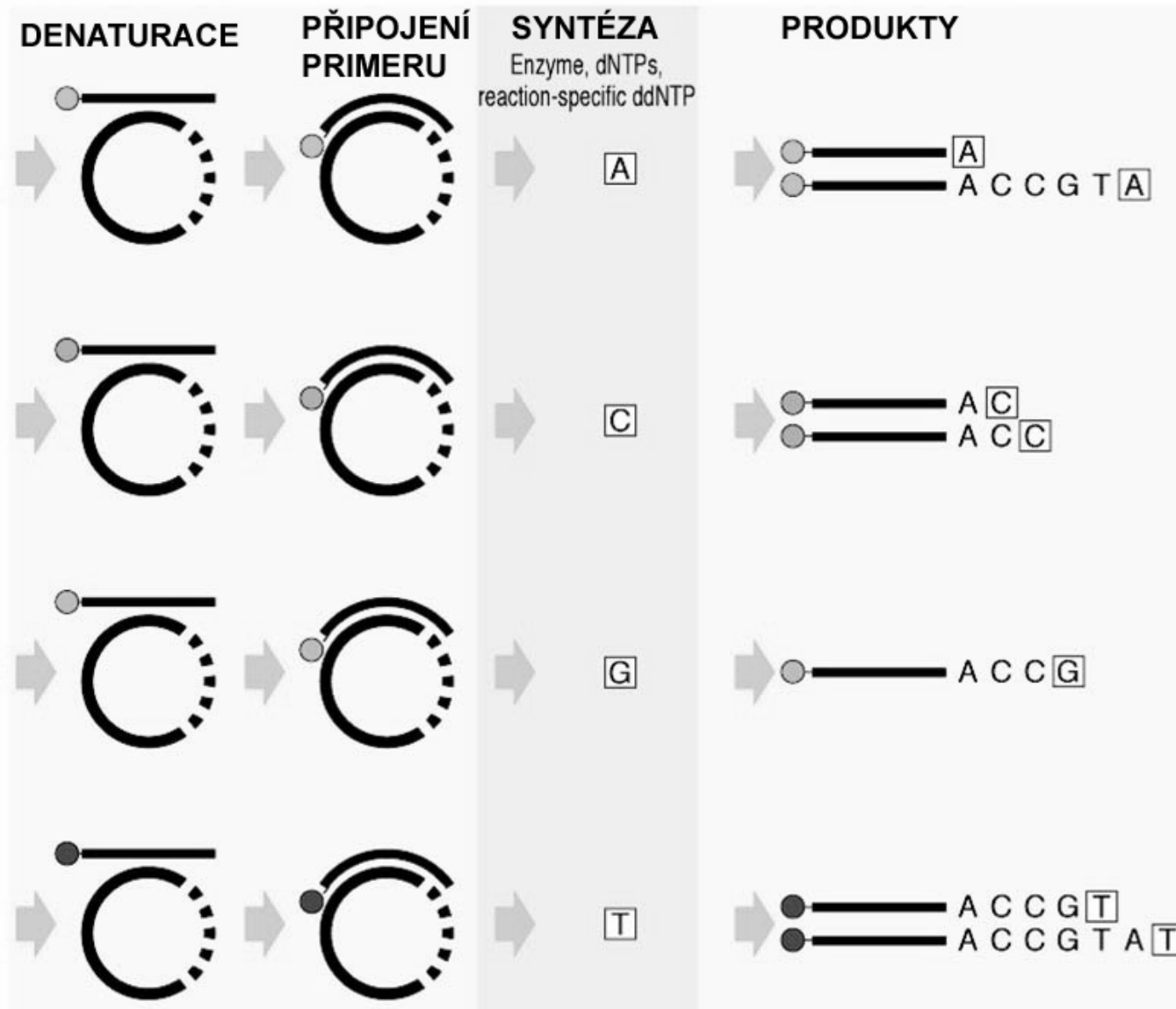
Automatické sekvencování DNA

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

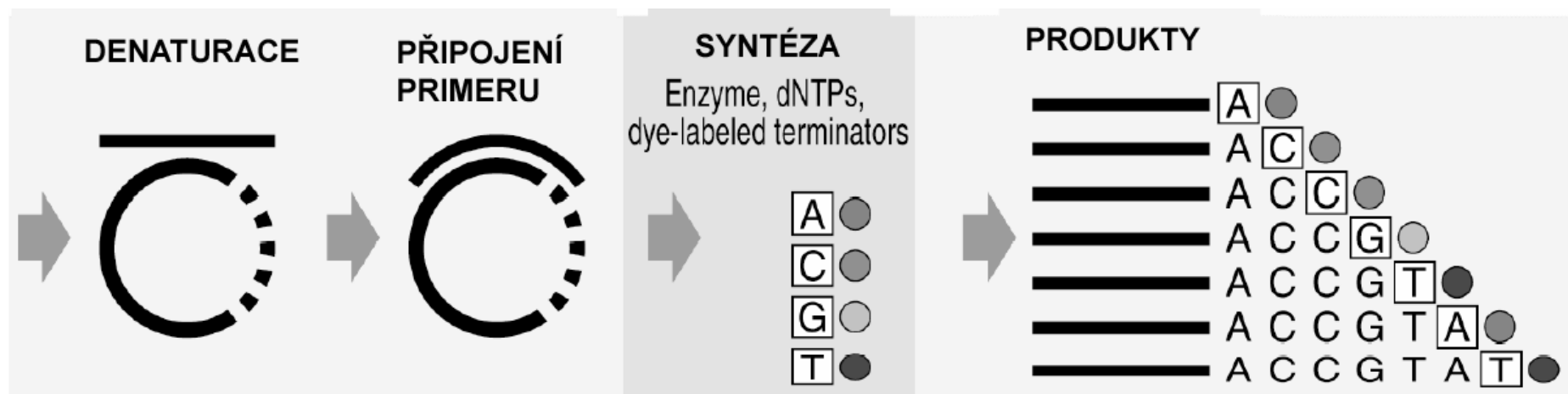
Asymetrická PCR pro sekvencování



Strategie barevných primerů

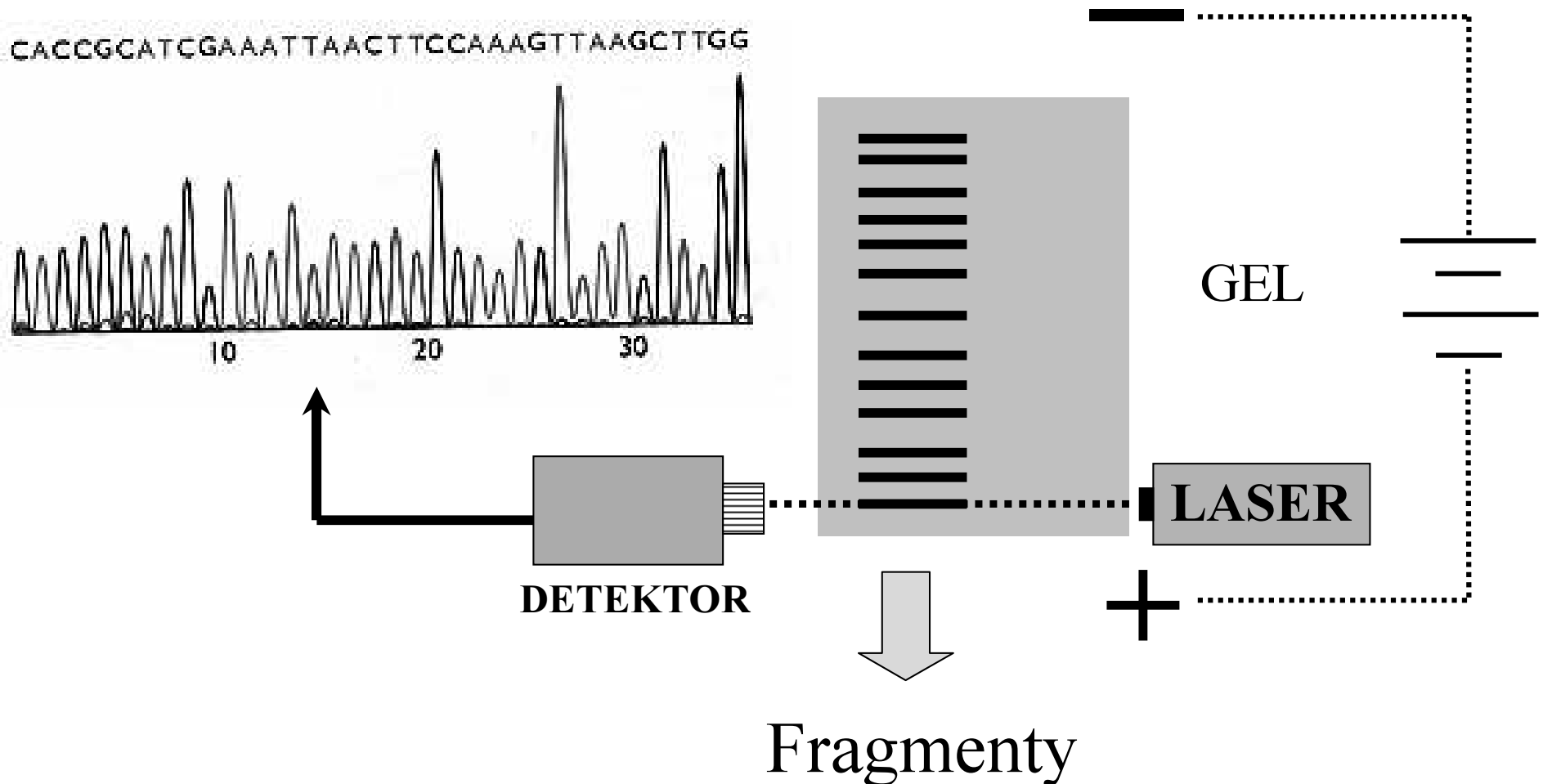


Strategie barevných terminátorů

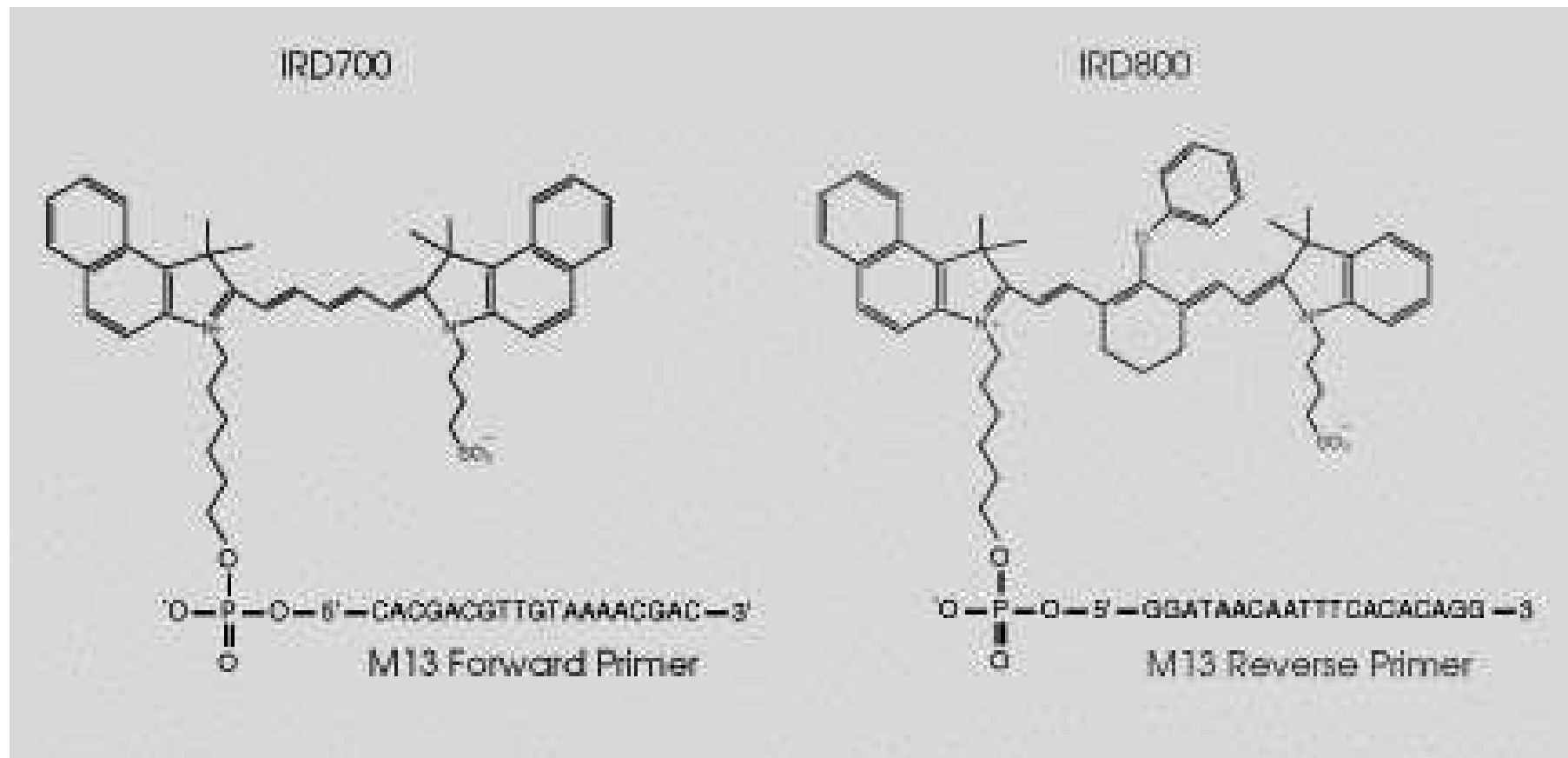


Princip detekce produktů

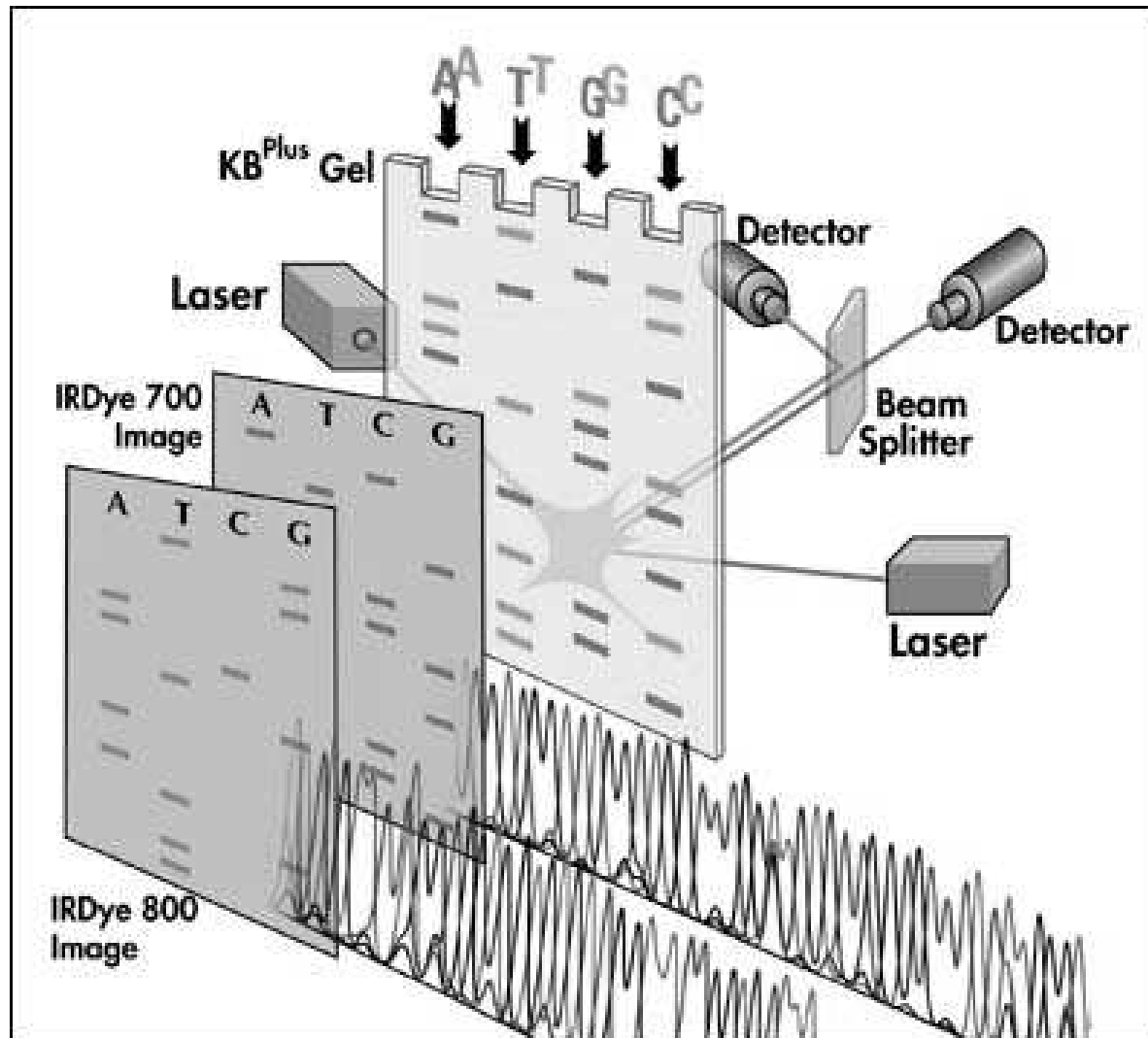
- Detekce produktů probíhá během elektroforézy pomocí laserového detektoru (laserem indukovaná fluorescence, LIF) napojeného na počítač, který vyhodnocuje sekvenci.



Příklad fluorescenčního značnického primeru



Vícenásobné detekce u různě značených primerů



Genetický analyzátor ABI 3100

Soustava
kapilár

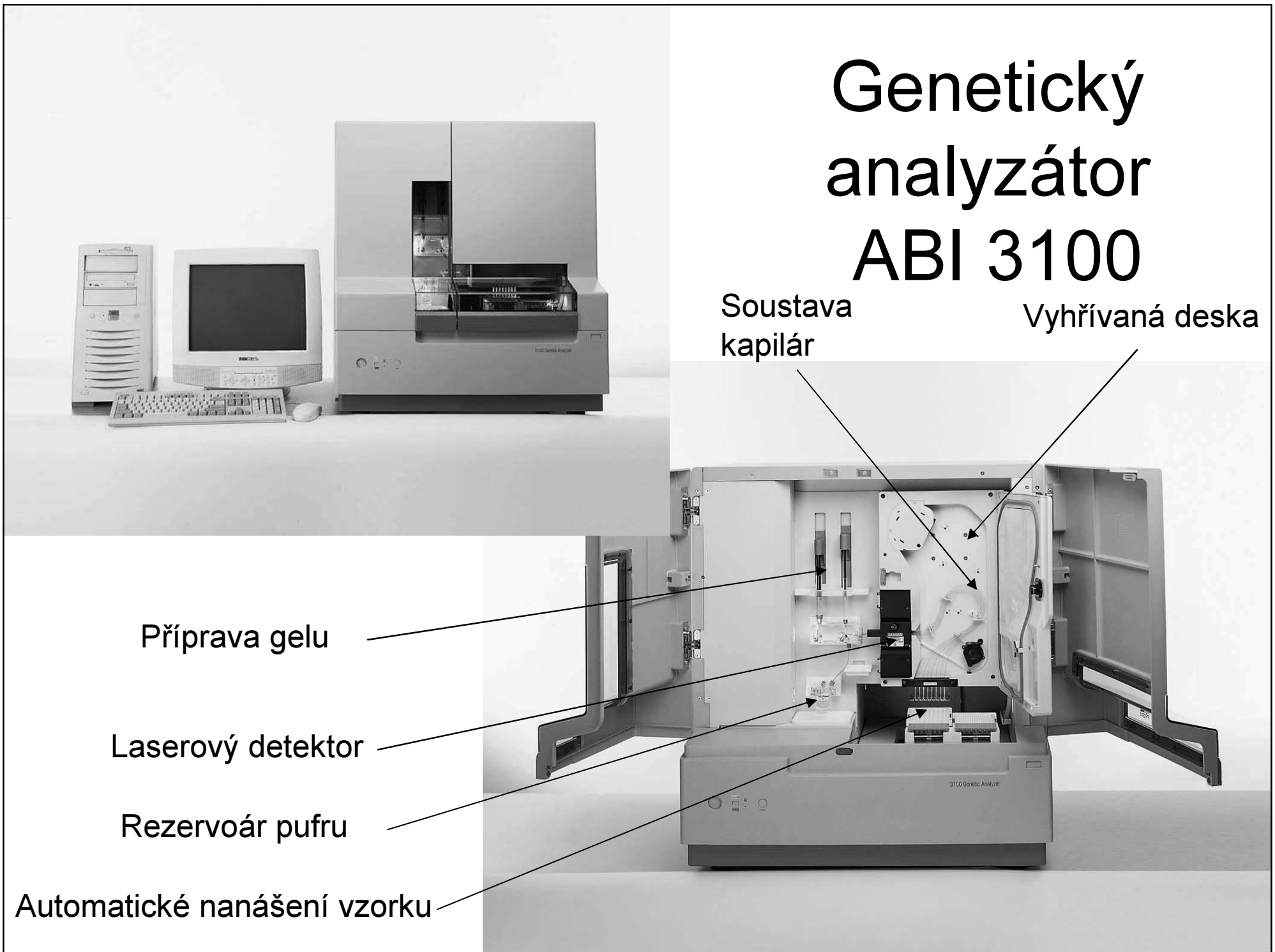
Vyhřívaná deska

Příprava gelu

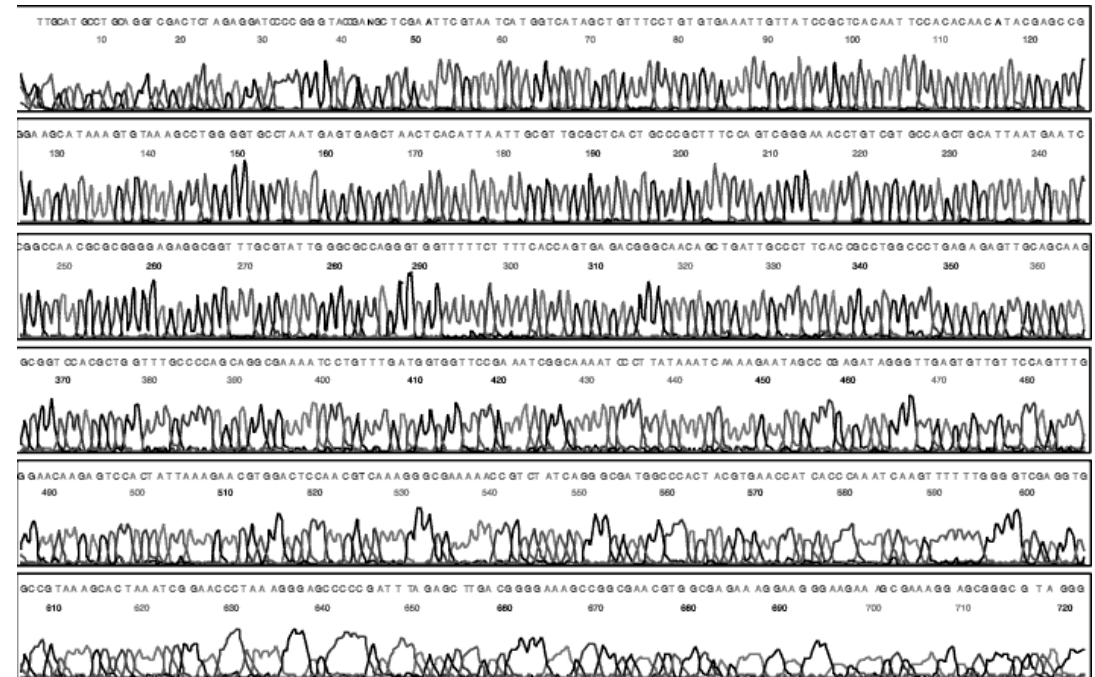
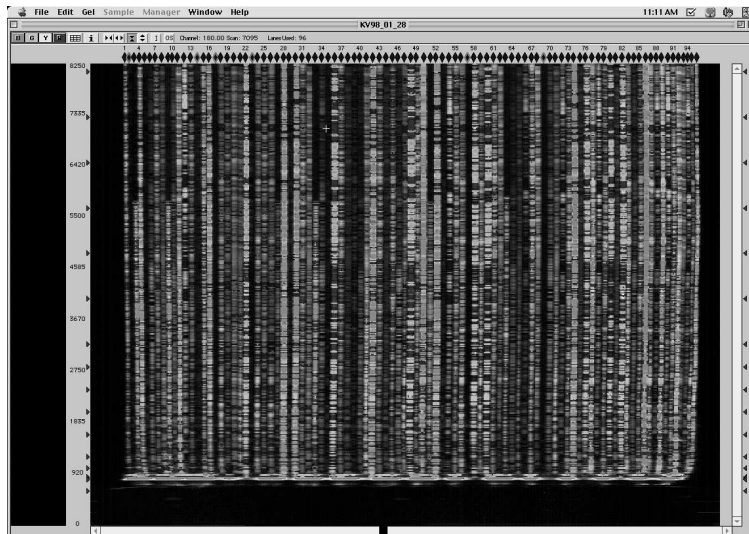
Laserový detektor

Rezervoár pufry

Automatické nanášení vzorku



Příklad výstupu



1 dráha na gelu

Genomové centrum zabývající se sekvencováním



Sekvencování genomů

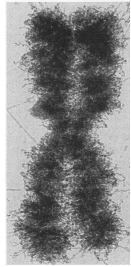
V praxi je velice často potřeba stanovit sekvenci fragmentu DNA, který je delší než průměrná délka 500 – 1 000 bází dosahovaná v jedné reakci.

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

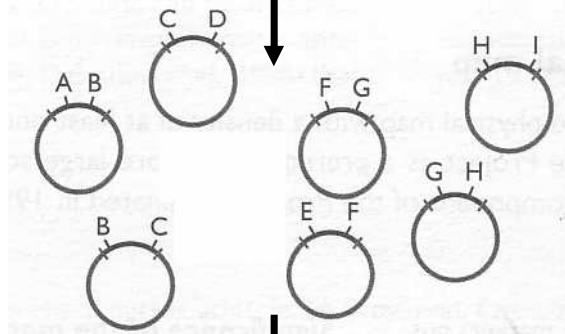


+



Vektor

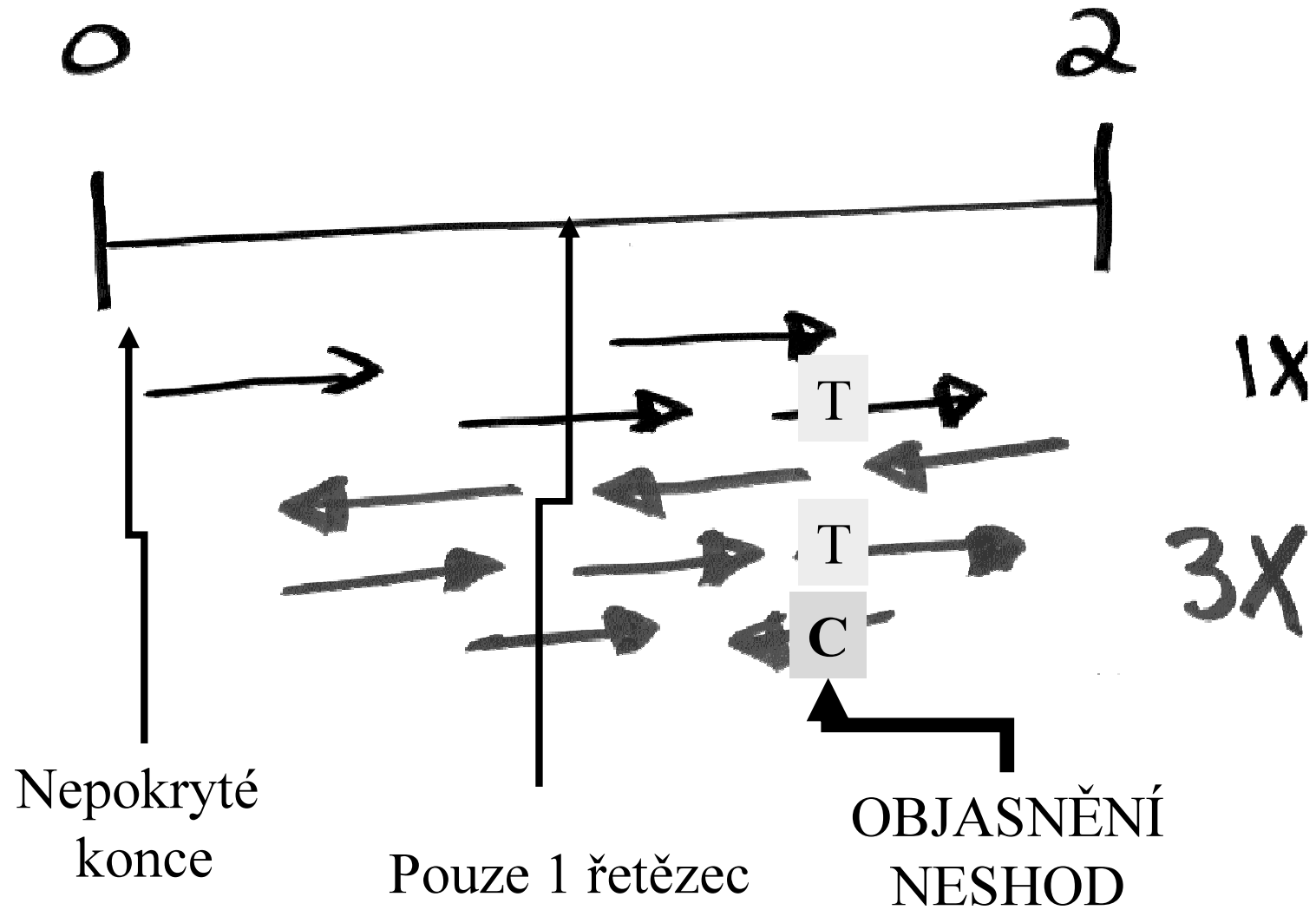
Úprava konců a klonování



Sestavení překrývajících se klonů



Náhodné sekvencování

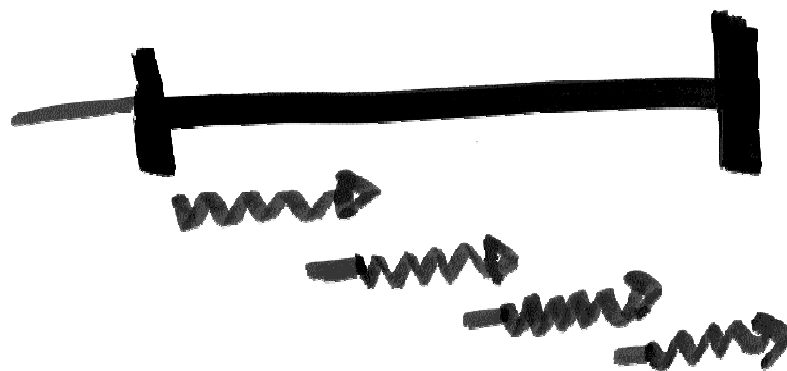


USPOŘÁDANÉ SEKVENCOVÁNÍ

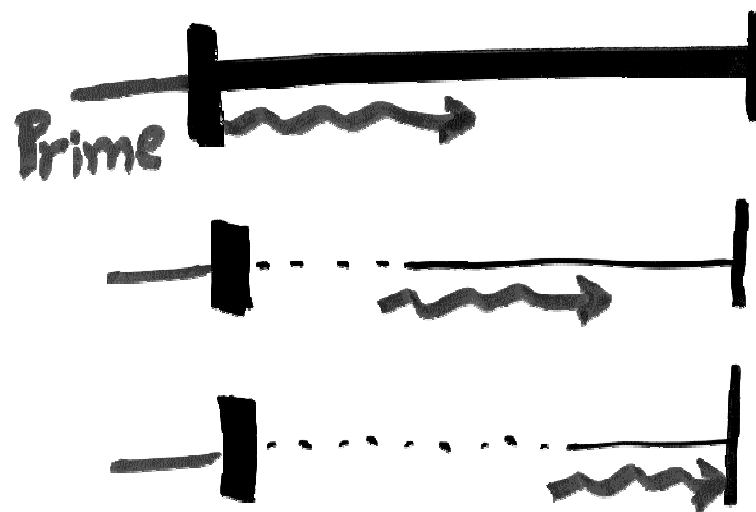
- Pro doplnění sekvence mezer zbývajících po náhodném sekvencování
- Pro sekvencování malých fragmentů DNA
- Dva odlišné přístupy:
 - **procházení primerem**
 - vyžaduje znalost sekvence, ke které se připojuje primer, který umožní prodloužení řetězce DNA-polymerázou.
 - získaná sekvence z první reakce 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

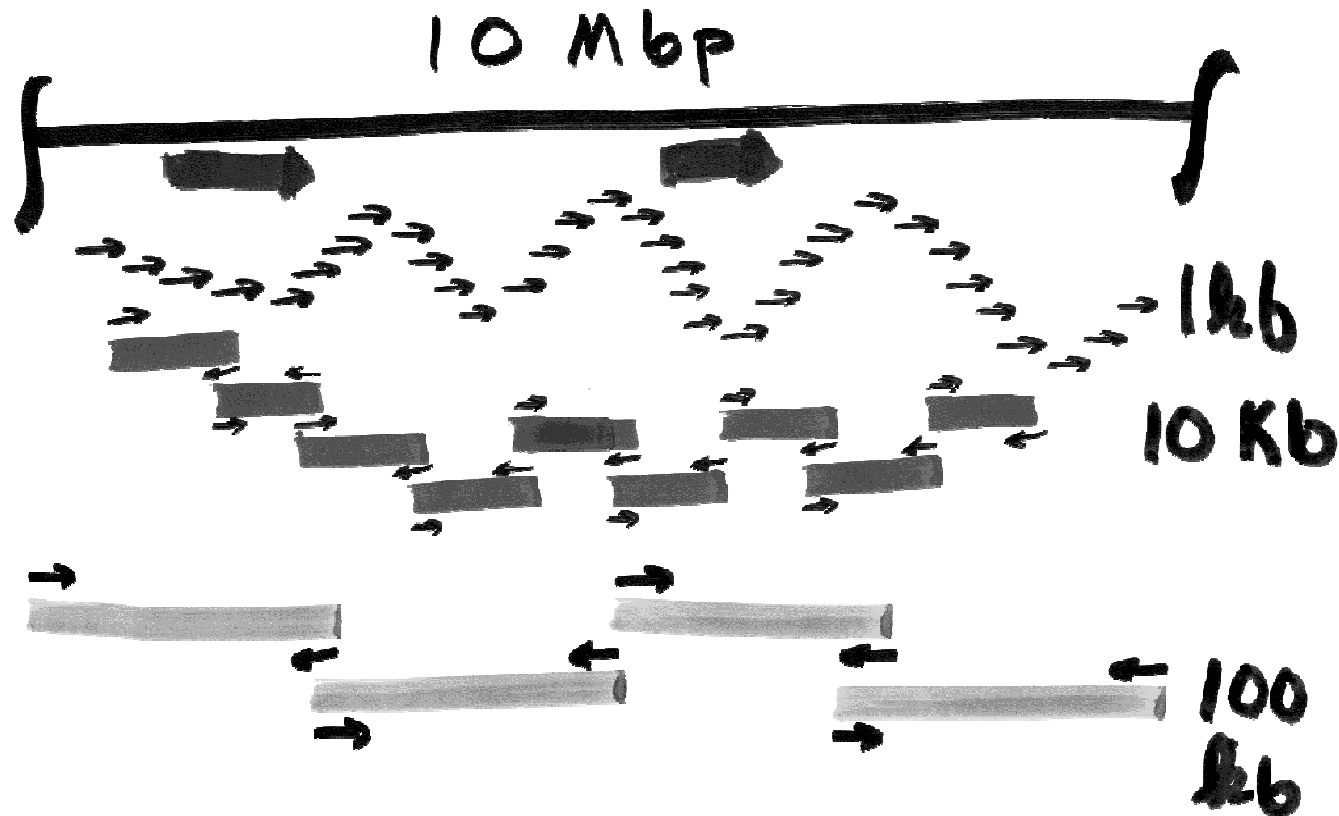


Sousední delece



DOKONČENÍ PROJEKTU

- Sestavení kontigů



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