

SMAMII-7

Sekvencování DNA

Cíle sekvencování

- Stanovení primární struktury DNA tj.
- Pořadí nukleotidů v molekulách DNA

Znalost sekvence DNA

- Lze použít k odvození aminokyselinové sekvence kódovaných proteinů
- K odvození regulace jejich tvorby
- Umožňuje detailně stanovit charakter mutací (které se projevují např. vznikem genetických chorob)
- Urychlila rozvoj dalších metod (např.PCR)

Jsou k dispozici principiálně odlišné postupy

- Chemická metoda založená na specifické degradaci řetězců NK pomocí chemických sloučenin (Maxam-Gilbertovo sekvencování)
- Enzymatická metody založená na inhibici syntézy nového řetězce (Sangerovo sekvencování)

1. Krokem obou metod

- Je příprava molekul DNA s přesně definovanými konci
- Nejčastěji se používají restriční fragmenty DNA klonované ve vhodném vektoru nebo
- PCR produkty

U obou metod musí být splněny tyto požadavky

- Definování jednoho z konců fragmentů DNA, jehož sekvence se stanovuje
- Vytvoření souboru ss molekul DNA, jejichž vzájemná velikost se liší o jedinou basi
- Rozdělení tohoto souboru fragmentů elektroforézou s takovou rozlišovací schopností, která umožňuje oddělit řetězce lišící se svou délkou o jedinou basi

Vyhodnocení získaných sekvencí

- S využitím počítačů a speciálních programů - vyhledání
- ORF (otevřené čtecí rámce), které mohou být potenciálními geny
- exonů a intronů a převedení sekvence nukleotidů do sekvence AK v proteinech
- Známých motivů na DNA, charakteristických pro regulační oblasti
- Repetitivních sekvencí
- Rozpoznávacích míst pro restriktázy (získá se komplexní restriční mapa)

Srovnání

- stanovené sekvence nukleotidů nebo z ní odvozené sekvence AK
- se sekvencemi uloženými v databankách
- v nichž se shromažďují údaje z celého světa

Chemická metoda sekvencování

- Podstatou je specifické rozštěpení molekuly DNA chemickými činidly v místech, kde je lokalizovaná báze určitého typu

Výchozím materiálem

- Je soubor identických fragmentů ss DNA
- Označených na jednom konci radioaktivní značkou

Každá ze 4 basí

- je modifikována tak, aby byl v tomto místě přerušen řetězec
- Používá se DMS (dimetylsulfát), NaOH, HCOOH (kys. mravenčí) a hydrazin
- Podmínky reakce se zvolí tak, aby byla poškozena v průměru pouze 1 base v řetězci
- Poté je DNA za vysoké teploty vystavena působení piperidinu, což vede k rozštěpení řetězce v zeslabených místech

Reakce je prováděna

- Ve velkém souboru molekul
- Proto je výsledkem štěpení soubor fragmentů DNA všech různých délek,
- Které odpovídají vzdálenosti bází příslušného typu od značeného konce výchozí molekuly DNA

Postup sekvencování probíhá v následujících krocích

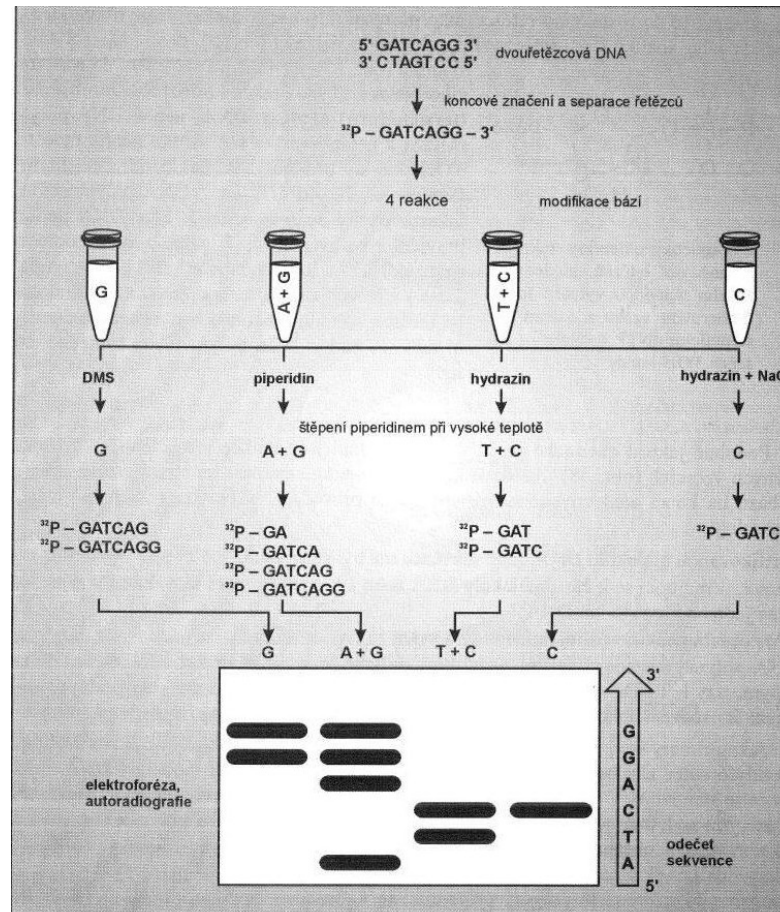
- Příprava zančených ss fragmentů DNA
- Rozdělení souboru fragmentů DNA do 4 vzorků
- Působení chemickou látkou, která specificky modifikuje jeden nebo dva typy bazí
- Působení chemickou látkou, která vede k rozštěpení řetězců DNA ve všech místech, v nichž byly báze modifikovány
- Rozdělení fragmentů DNA elektroforézou v denaturujícím polyakrylamidovém gelu, vzorky z každé ze 4 reakcí jsou na gel naneseny vedle sebe v definovaném pořadí
- Autoradiografická detekce fragmentů, detekovány budou pouze ty fragmenty, které nesou označený konec
- Stanovení sekvence DNA z autoradiogramu odečtem poloh pásů v jednotlivých drahách

■

Tabulka 2 Chemické modifikace bází používané při Maxamově–Gilbertově sekvencování

Báze	Specifická modifikace
G	Metylace dusíku N ⁷ dimetylsulfátem při pH 8,0 způsobuje, že vazba C ⁸ –C ⁹ je citlivá ke štěpení.
A + G	Piperidin při pH 2,0 zeslabuje glykosidovou vazbu adeninu a guaninu protonací dusíkových atomů v purinových cyklech.
C + T	Hydrazin otevírá pyrimidinové cykly, které recyklují do pětičlenných, citlivých ke štěpení.
C	Hydrazin za přítomnosti NaCl (1,5 M) reaguje pouze s cytozinem.
A > C	Hydroxid sodný (1,2 N) při 90 °C způsobuje silné štěpení u A a slabé štěpení u C.

Chemická metoda sekvencování



Obr. 36 Chemické sekvencování DNA podle Maxama a Gilberta

Nevýhody a výhody Maxam-Gilbertova sekvencování

- Data bývají nejednoznačná (reaktivita chemických činidel je ovlivněna nečistotami)
- Používá se radioaktivní značení
- Poskytuje kratší sekvence
- Postup je laboratorně náročnější
- Umožňuje stanovit vazbu proteinu na DNA (footprint)

2. Enzymatická metoda sekvencování (Sangerova sekvencování)

- DNA, jejíž sekvence má být stanovena, je použita jako matrice
- Pro syntézu komplementárních řetězců různé délky
- Pomocí DNA polymerázy

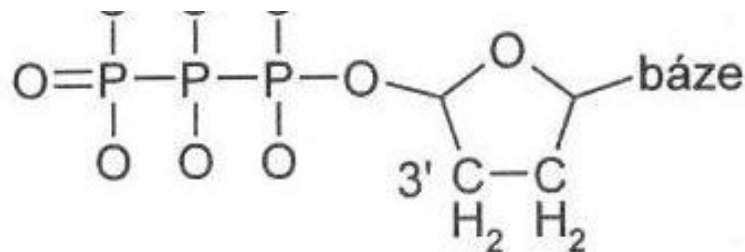
Vlastnosti DNA polymerázy využité pro sekvencování

- Schopnost vytvářet přesné kopie molekuly DNA
- Schopnost specifické syntézy DNA řetězce ve směru 5' - 3' od primeru s volnou 3'OH skupinou

Syntéza řetězce na matricové DNA

- Je zahájena od místa, ke kterému je připojen sekvenčně specifický primer pro sekvencování
- A ukončena v místě kde se do rostoucího řetězce inkorporuje místo normálního dNTP dideoxyribonukleosidtrifosfát)
- Postrádá 3'OH skupinu a
- Funguje jako koncový inhibitor (terminátor) syntézy DNA

Ukončení řetězce



Obr. 37 2',3'-dideoxynukleotidy inkorporované do řetězců nukleových kyselin nemohou vytvořit fosfodiesterovou vazbu s dalším přístupujícím dNTP v důsledku absence 3'OH-konce

Vhodně zvolený poměr

- ddNTP a dNTP (obvykle 1:100) v reakční směsi
- Rozhoduje o tom, jak dlouhé řetězce, náhodně zakončené v místech začlenění ddNTP
- Budou DNA polymerázou syntetizovány

Provedení reakce

- Ve 4 zkumavkách, každá pro stanovení pozice jedné baze
- Reakční směs obsahuje:
- Purifikovanou molekulu DNA, jejíž sekvence má být stanovena
- Primer, připojící se k části molekuly DNA nebo k místu připojení na vektoru, v případě, že jde o klonovanou DNA
- Směs 4 normálních dNTP a jeden ze 4ddNTP
- DNA polymerázu

Jako DNA polymeráza se používá

- Klenowův fragment DNA polymerázy
- T 7 DNA polymeráza zbavená 3' exonukleázové aktivity (Sequenáza)
- Zpětná transkriptáza
- Taq DNA polymeráza

Jako primery lze použít

- Krátké restriční fragmenty
- Synteticky připravené oligonukleotidy (18 bází)
- Stejně primery, se kterými byl fragment DNA amplifikován
-

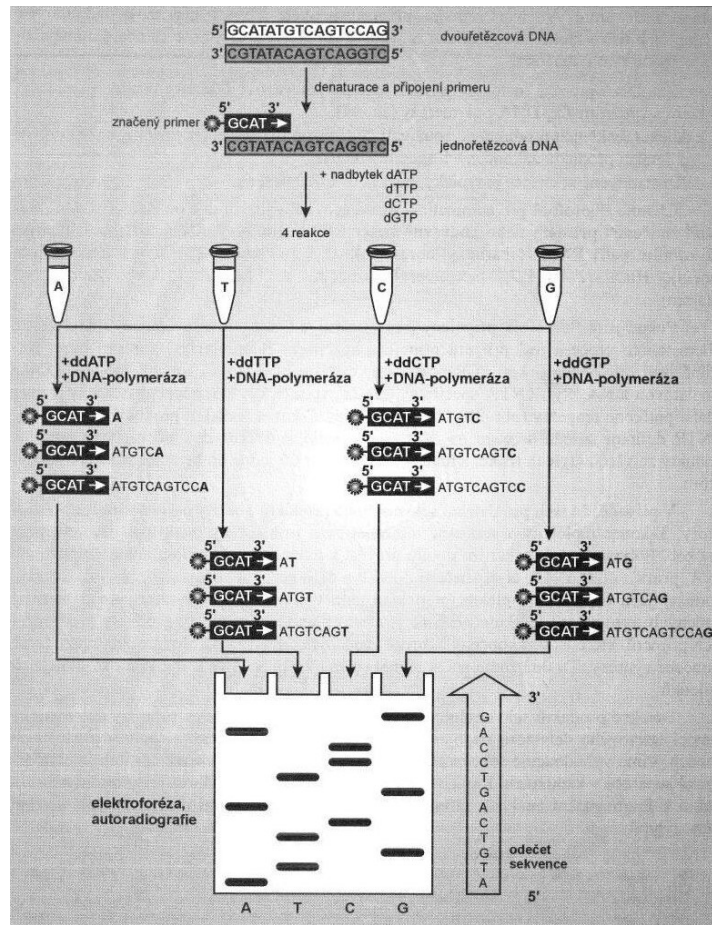
Řada vektorů je pro účely sekvencování

- Cíleně upravena
- Po obou stranách MCS obsahuje krátké specifické sekvence, k nimž se připojují
- Universální sekvenační primery
- Např. Vektoty odvozené od bakteriofága M13 – M13mp18, M13mp19, které umožňují
- Sekvencovat oba řetězce naklonované DNA

Pro umožnění detekce nově syntetizovaných řetězců

- Je primer, ddNTP nebo jeden ze 4 dNTP radioaktivně nebo neradioaktivně označen
- Po proběhnutí reakce se vytvořené produkty denaturují a
- Separují na polyakrylamidovém denaturujícím gelu
- Odečtení sekvence z autoradiogramu nebo hybridizační membrány (u neradiaktivně značeného primeru)
- Při manuálním provádění je možné stanovit sekvenci dlouhou 300 až 400 bází

Enzymatická metoda sekvencování



obr. 38 Enzymové sekvencování DNA podle Sangera

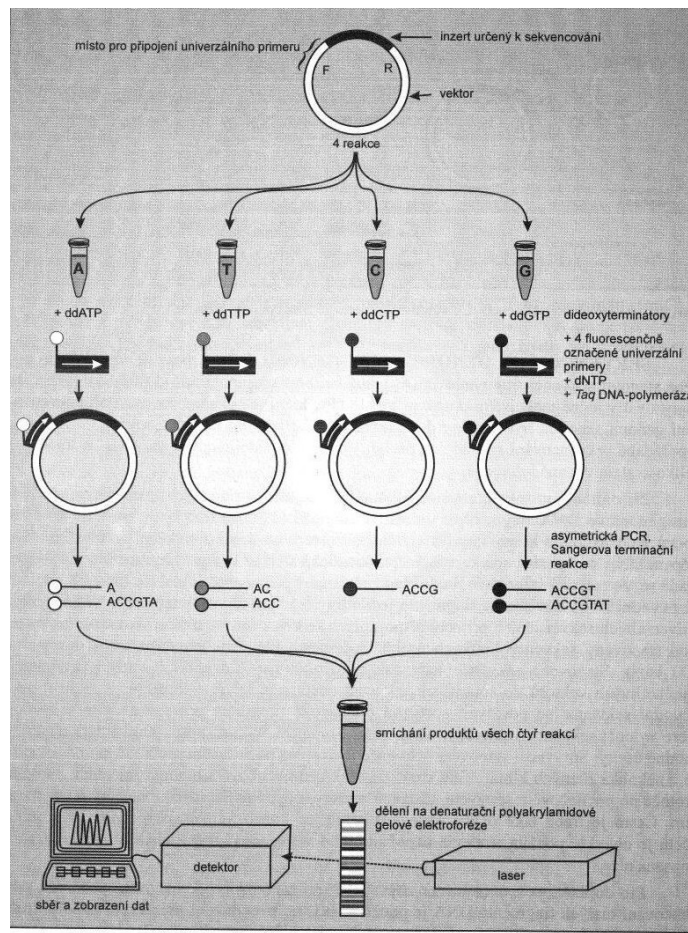
Automatické sekvencování DNA

- Pokrok v enzymatické metodě
- Plně automatizované přístroje pro separaci reakčních produktů, detekci, shromáždění dat a analýzu pořadí bází
- Mnohem rychlejší
- Délka stanovené sekvence je mezi 500-1000bp

Odlišnosti automatického sekvencování

- Probíhá metodou asymetrické PCR (s nadbytkem 1 primeru nebo jen s 1 primerem)
- S využitím Taq DNA-polymerázy
- K detekci reakčních produktů se 4 různé fluorescenční značky, každá určená pro detekci produktů zakončených specifickou bází

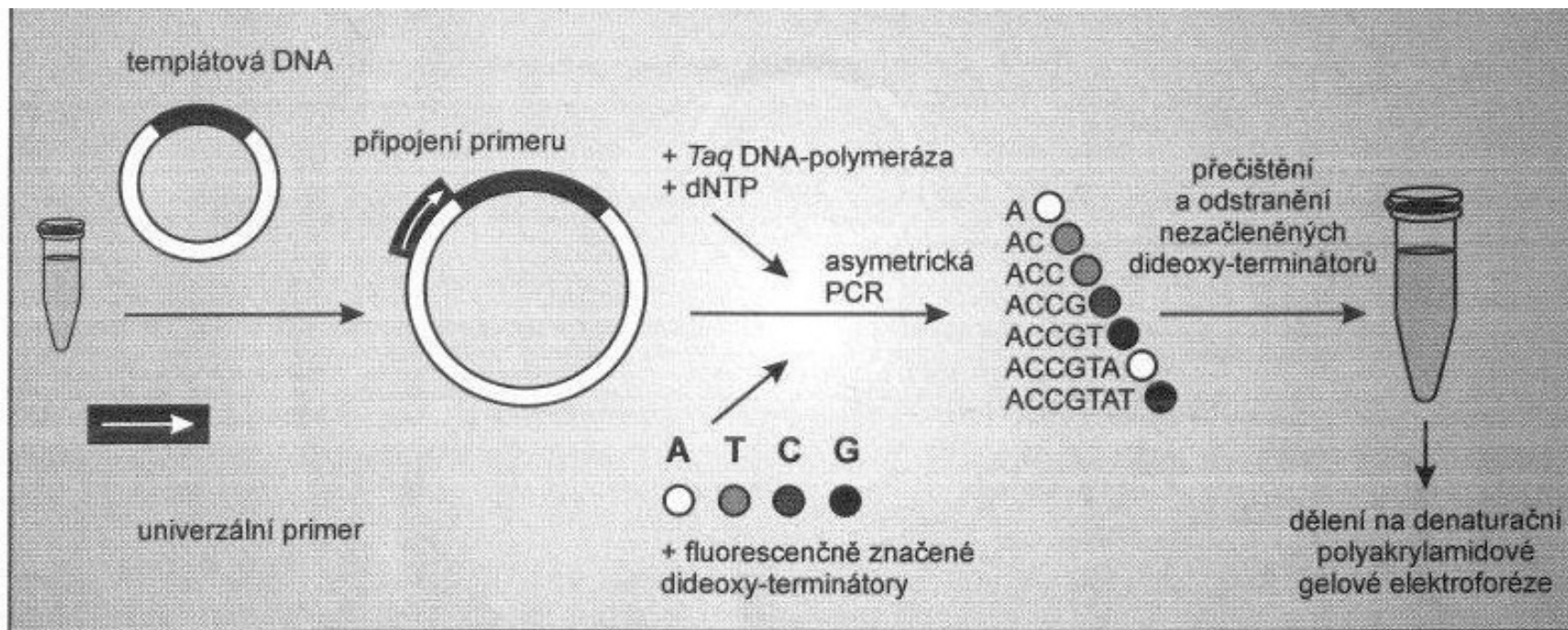
Automatické sekvencování



obr. 39 Automatické sekvencování využívající barevné značení primerů

Chemie fluoroforů

- Využívá 2 odlišné přístupy:
- Barevně značené primery
- Barevně značené terminátory
- Fluorofory: FAM (6-karboxyfluorescein)
- TET (6-karboxy-2',4,7,7'-tetrachlorofluorescein)
- HEX (2',4,4',5',7,7'-hexachlorofluorescein)
- TAMRA (5-karboxytetrametylrhodamin)
- Primer definuje 5'konec molekul produktů a začleněný ddNTP definuje totožnost báze na 3'konci



Obr. 40 Automatické sekvencování využívající barevné značení terminátorů

Polymerisační reakci

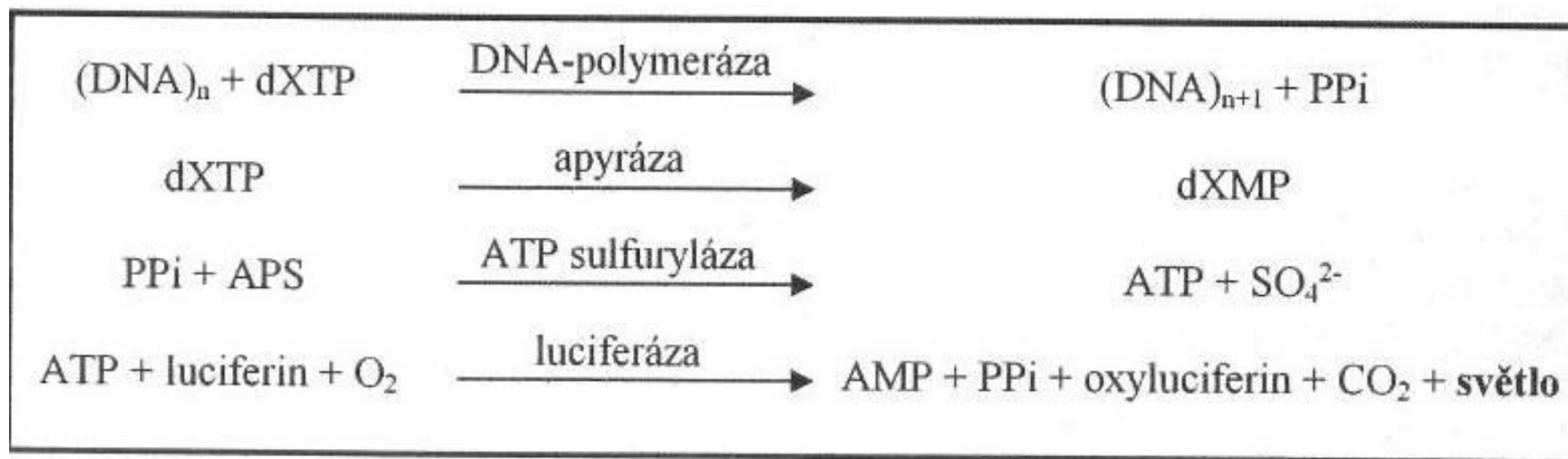
- Lze provést v 1 zkumavce obsahující
- Templátová DNA, primer, 4 dNTP, 4 značené ddNTP
- Výhodou použití barevně značených terminátorů je skutečnost, že jsou vizualizovány pouze produkty zakončené barevně značeným ddNTP (a nikoliv produkty předčasně ukončené syntézy – snížení signálu pozadí)
- Detekce produktů probíhá v průběhu elektroforézy automaticky pomocí laserového detektoru napojeného na počítač
- U novějších aparatur probíhá elektroforetická separace v kapilárách

Další metody sekvencování

- Hydrogensířičitanové sekvencování (pro odlišení C a 5-metylC u obratlovců a vyšších rostlin)
- Pyrosekvencování (nevyžaduje značené primery nebo dNTP ani elektroforézu). Je založené na uvolnění pyrofosfátu (PPi) při enzymatické syntéze DNA. Následuje kaskáda enzymatických reakcí a v konečném kroku je emitováno viditelné světlo.
- Sekvencování pomocí hybridisace (SBH). Varianta je prováděna s využitím technologie DNA čipů.
- Minisekvencování (pro ověření ss polymorfismů, je založena na prodloužení 3' konce primeru o jediný značený nukleotid)

Pyrosekvencování

- Sekvenační primer je hybridisován s ss DNA a je inkubován s DNA polymerázou I z E.coli, ATP sulfurylázou, luciferázou, apyrázou, adenosin 5'-fosfosulfátem (APS), luciferinem



Obr. 41 Přehled reakcí probíhajících při pyrosekvencování

Potom se postupně přidávají

- (jeden po druhém) všechny 4 dNTP (označované dXTP)

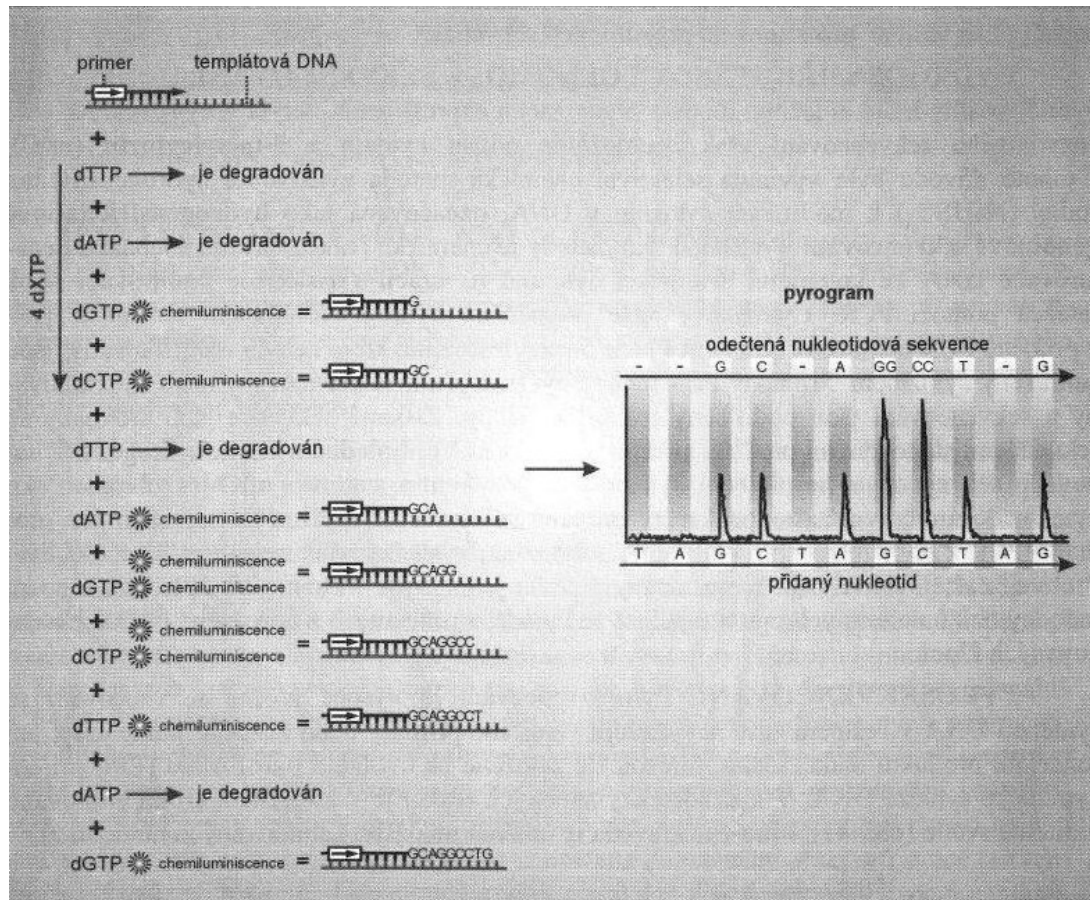
Pokud se na matricové molekule vyskytuje komplementární base k přidanému dXTP, DNA polymeráza katalyzuje připojení nukleotidu k primeru

- Pokud na matrici není komplementární sekvence, nukleotid je degradován apyrázou
- Každé připojení je provázeno uvolněním pyrofosfátu (PPi DNA) v ekvimolárním množství k zabudovanému primeru

Uvolněné P_Pi

- jsou kvantitativně převáděny ATP sulforylázou za přítomnosti APS a ATP, což umožňuje luciferázou zprostředkovanou konverzi luciferinu na oxyluciferin
- Oxyluciferin vytvoří světelný záblesk, který lze zaznamenat detektorem fotonů a zobrazit jako vrchol na pyrogramu
- Namísto standardního dATP je používán 2'-deoxyadenosin-5'-tio-trifosfát, který je zpracován DNA polymerázou ale nikoliv luciferázou

Pyrosekvencování DNA

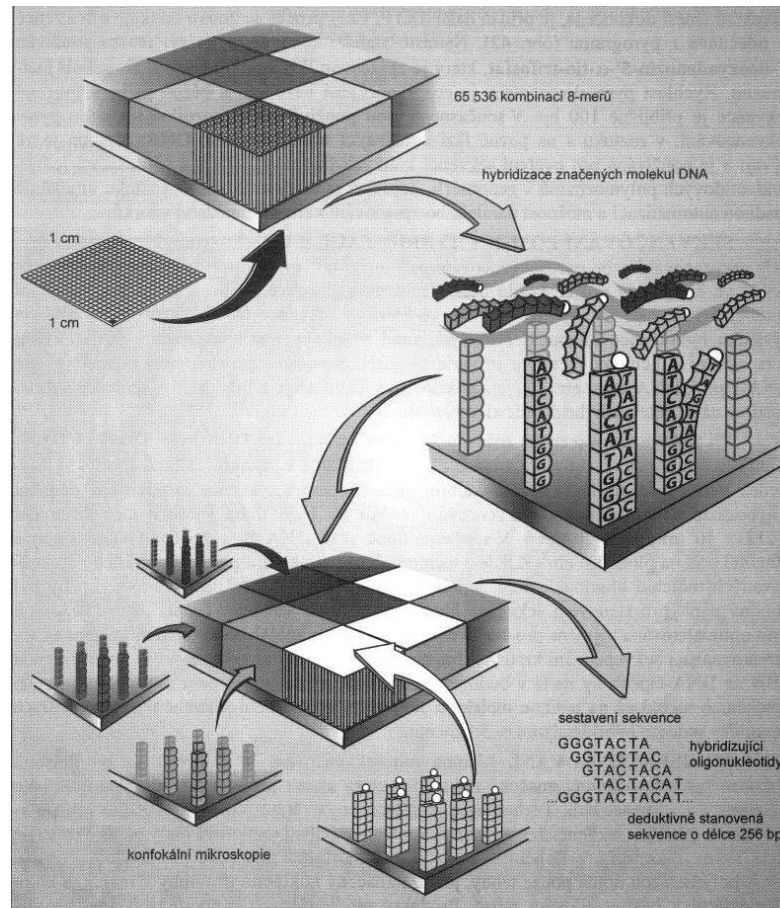


Obr. 42 Princip pyrosekvencování DNA

Rychlost pyrosekvencování

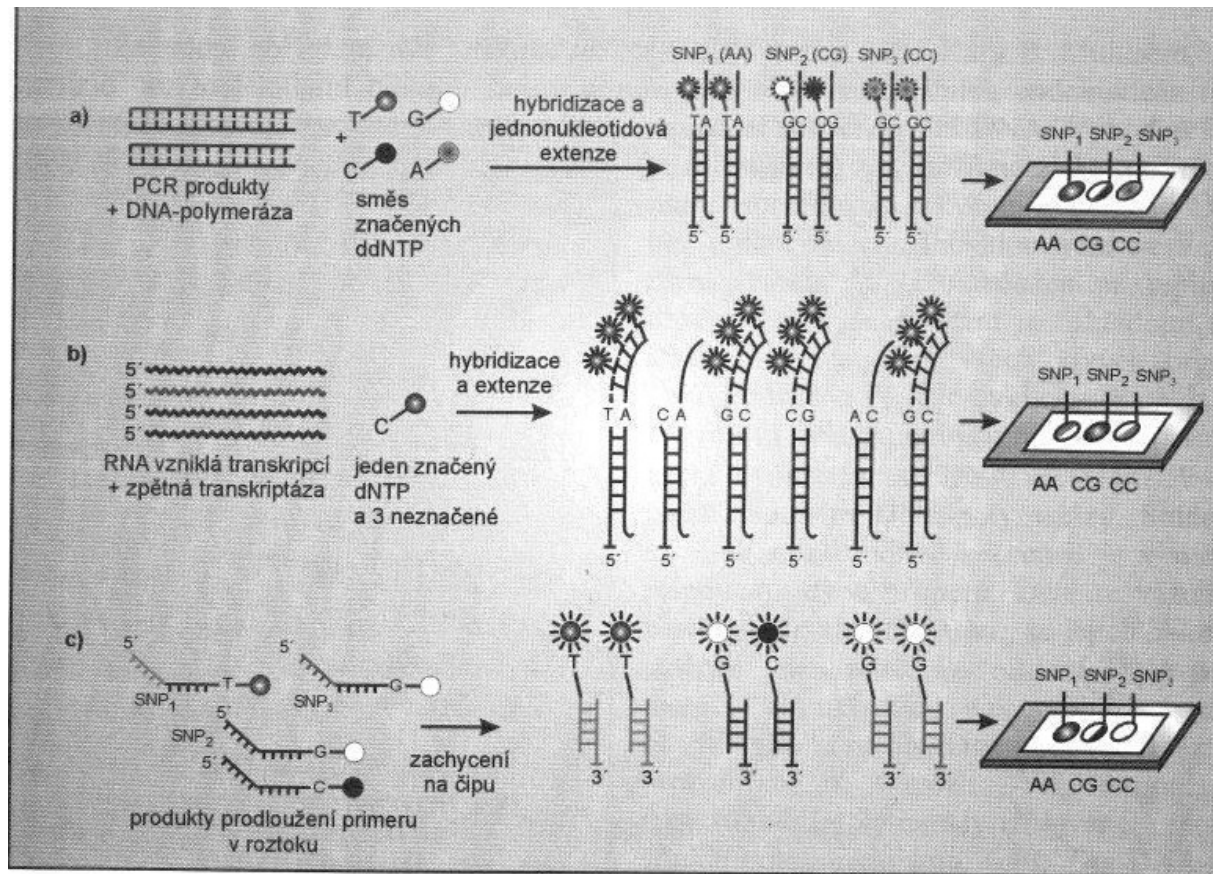
- 1 base za minutu, běžná délka 100 bází
- Pyrosekvencování v roztoku a na pevné fázi (s využitím imobilizované DNA)

Sekvencování pomocí hybridizace s použitím DNA čipu



Obr. 43 Princip sekvencování pomocí hybridizace s použitím DNA-čipu

Minisekvencování na DNA čipu



Obr. 44 Varianty minisekvencování prováděné na DNA-čipu