

Секвенирование ДНК

Доцент кафедры
молекулярной биологии и
генетики, к.м.н. Замарина
Т.В.

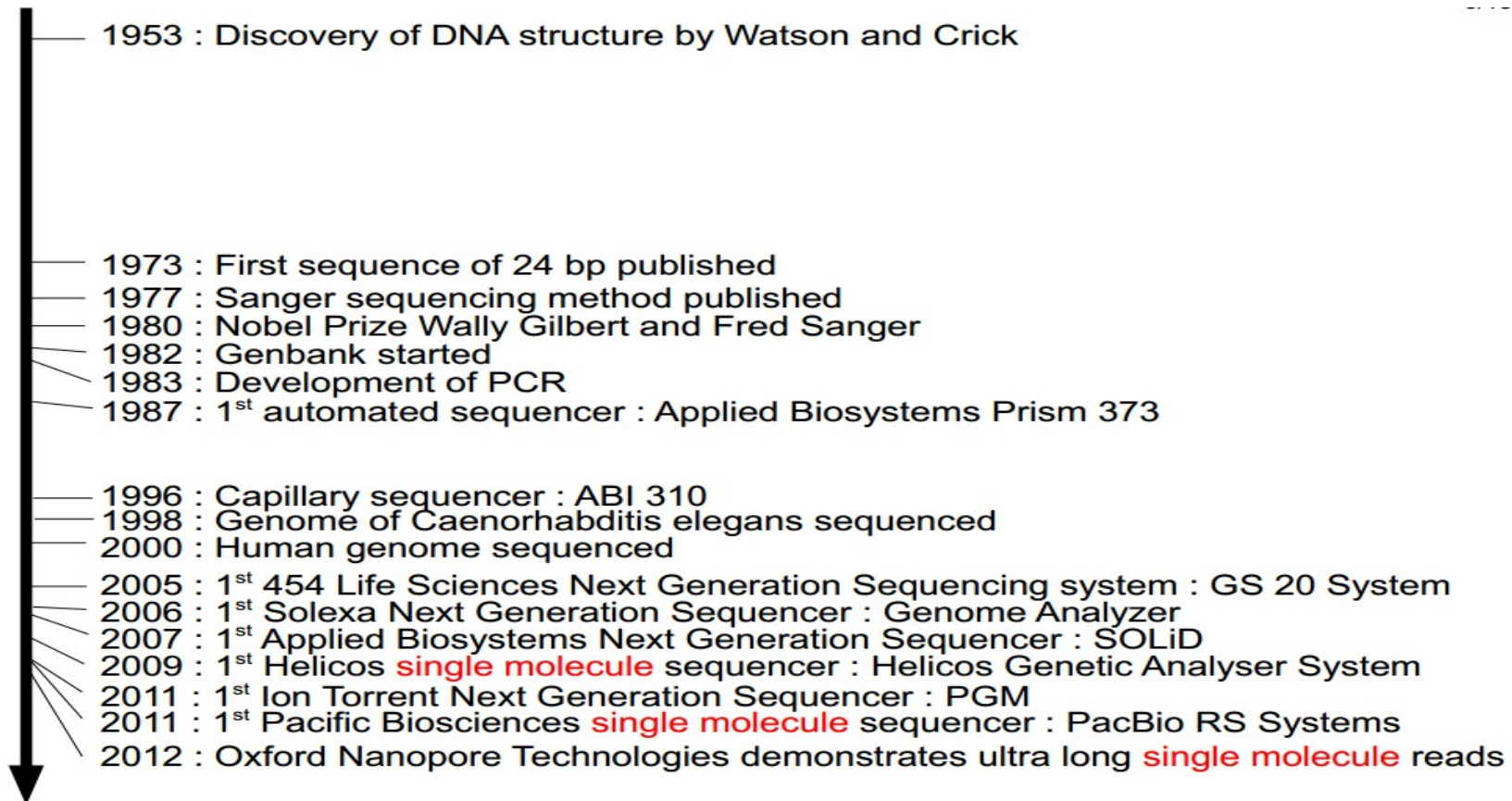
Секвенирование биополимеров

(белков и нуклеиновых кислот — ДНК и РНК)

— определение их аминокислотной или нуклеотидной последовательности (от лат. *sequentum* — последовательность). В результате секвенирования получают последовательности участков генов, целых генов, тотальной мРНК и даже полных геномов организмов

1977 r. Maxam-Gilbert and Sanger Sequencing

2005 r. Next-Generation Sequencing



Секвенирование ДНК по Максаму и Гилберту: метод химической дегградации

- В 1976 г. А. Максамом и У. Гилбертом был разработан метод секвенирования, основанный на специфической химической дегградации фрагмента ДНК, радиоактивно меченного с одного конца.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA
Vol. 74, No. 2, pp. 560–564, February 1977
Biochemistry

A new method for sequencing DNA

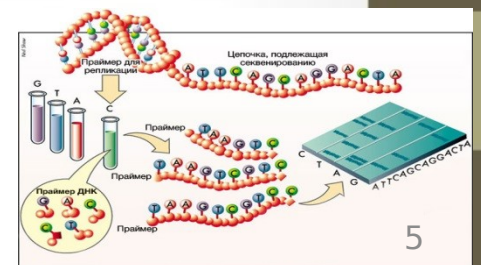
(DNA chemistry/dimethyl sulfate cleavage/hydrazine/piperidine)

ALLAN M. MAXAM AND WALTER GILBERT

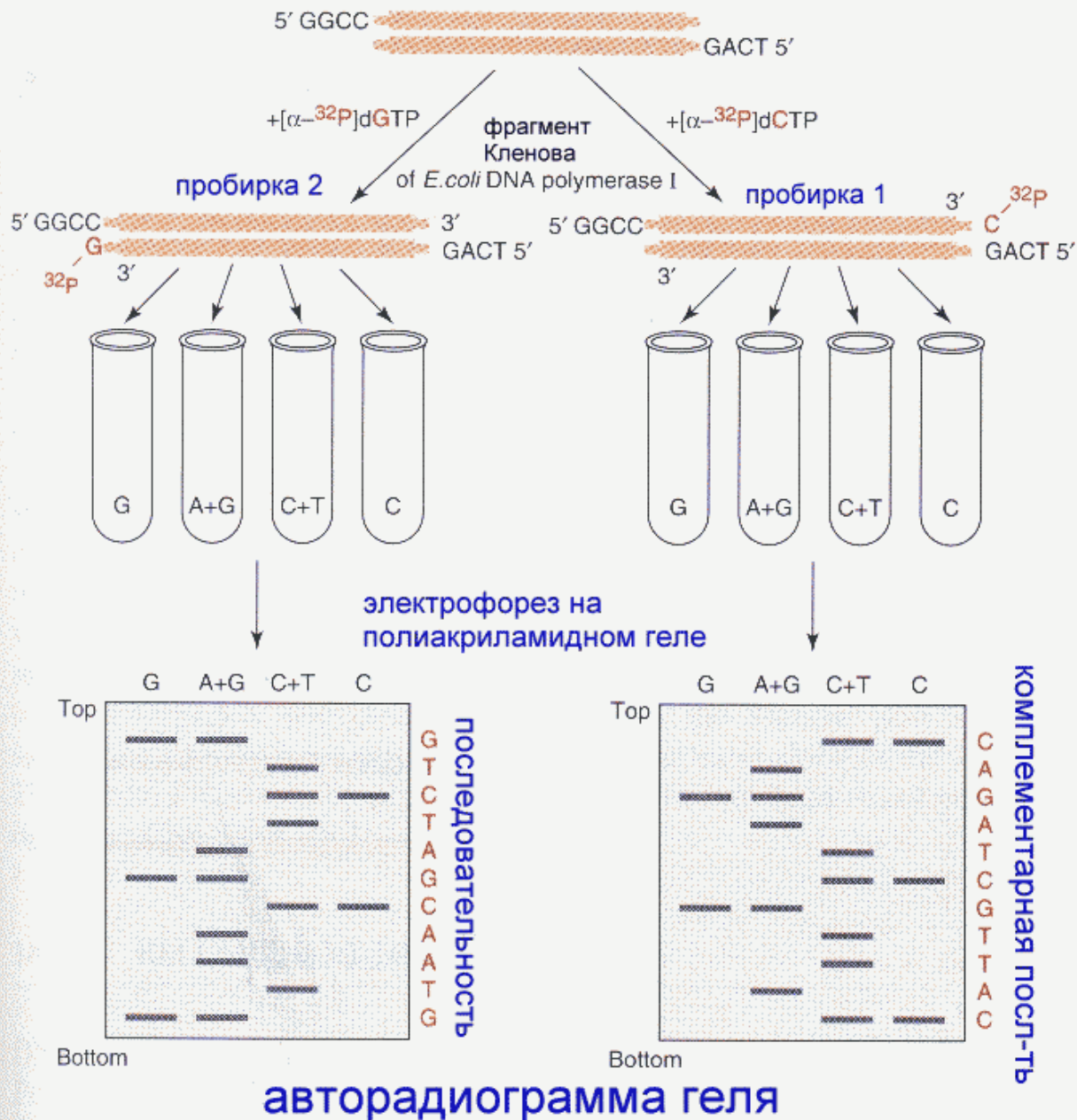
Department of Biochemistry and Molecular Biology, Harvard University, Cambridge, Massachusetts 02138

Contributed by Walter Gilbert, December 9, 1976

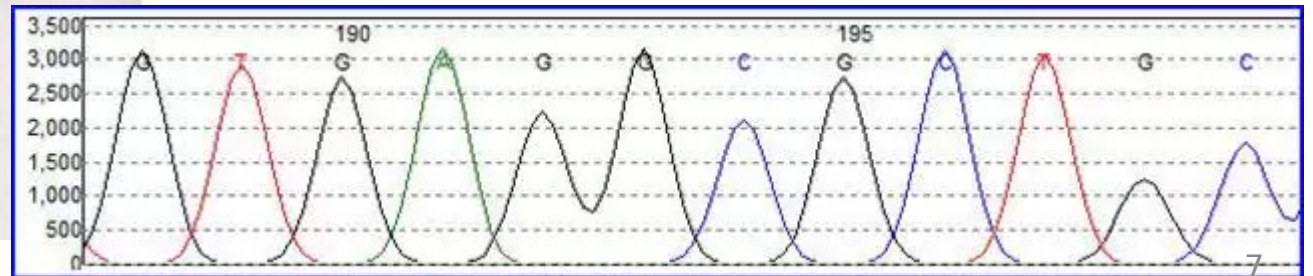
Препарат меченной ДНК разделяли на четыре аликвоты и каждую обрабатывали реагентом, модифицирующим одно или два из четырех оснований. А. Максам и У. Гилберт предложили модифицировать пуриновые основания диметилсульфатом. При этом происходит метилирование адениновых остатков по азоту в положении 3, а гуаниновых - по азоту в положении 7. Обработка образца ДНК соляной кислотой при 0°C приводит к выщеплению метиладенина. Последующая инкубация при температуре 90°C в щелочной среде вызывает разрыв сахарно-фосфатной цепи ДНК в местах выщепления оснований. Обработка пиперидином приводит к гидролизу образца по остаткам метилгуанина. Пиримидиновые основания модифицируют гидразином. Условия реакций авторы подбирали таким образом, чтобы в итоге получить полный набор субфрагментов разной длины.



секвенирование ДНК по Максему-Гилберту



A T G C

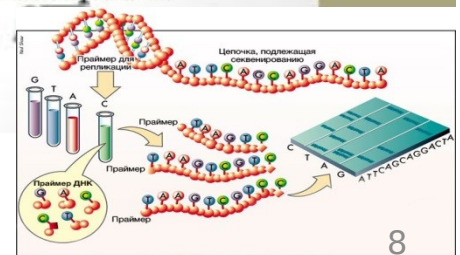


Секвенирование по Сэнгеру

- Первым методом секвенирования, который учёные сумели применить для обработки целых геномов (в том числе генома человека), стало секвенирование по Сэнгеру (Sanger sequencing). Смысл таков: участок ДНК клонируется, после чего полученная смесь делится на четыре части. Каждая часть помещается в активную среду, где присутствуют:

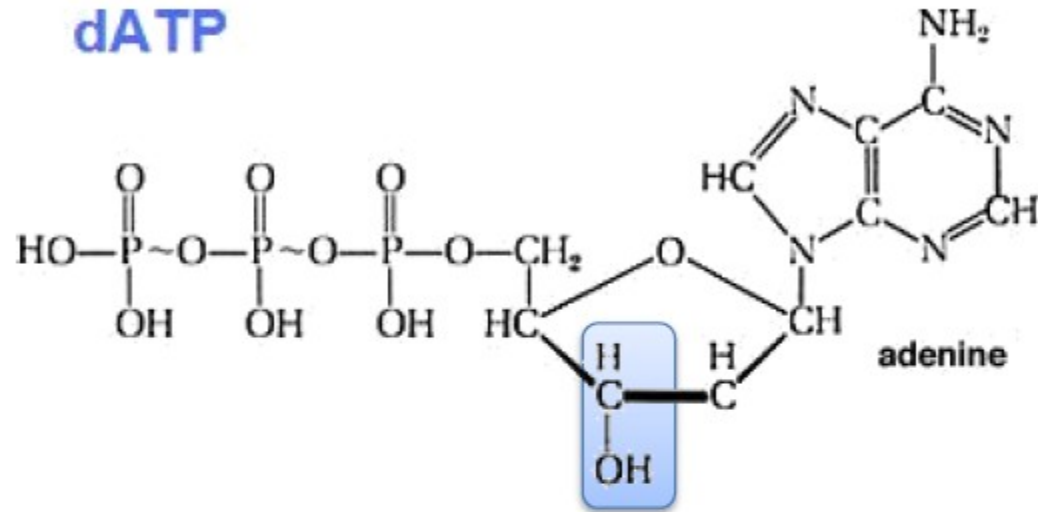
- ДНК-полимераза, которая занимается репликацией,
- праймеры, необходимые для начала процесса репликации,
- смесь всех четырёх нуклеотидов, которые будут служить «кирпичиками» для строительства новых копий ДНК,
- и специальные вариации одного из нуклеотидов (ровно один вид нуклеотидов для каждой части), которые прекращают дальнейшее копирование молекулы ДНК.

Именно при помощи сэнгеровского секвенирования был впервые расшифрован геном человека.

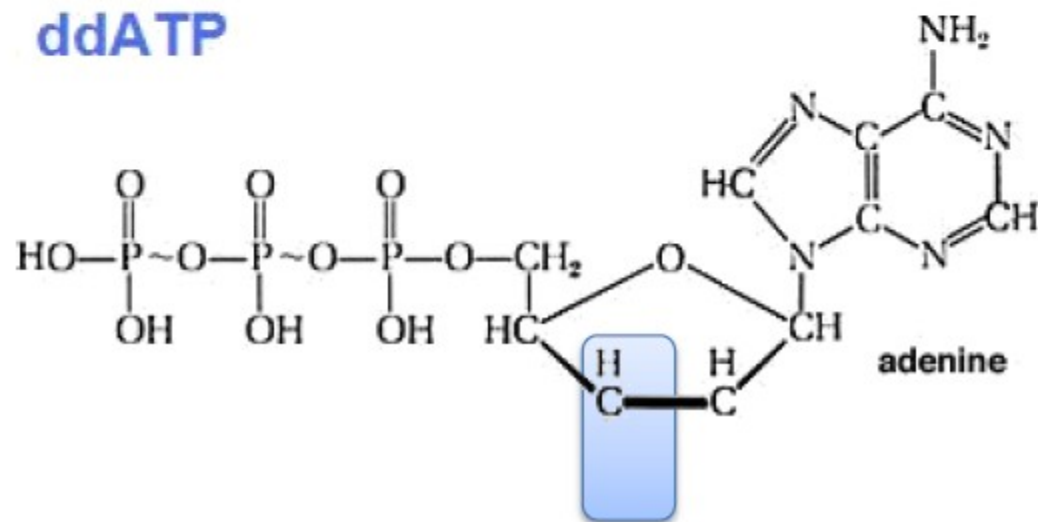


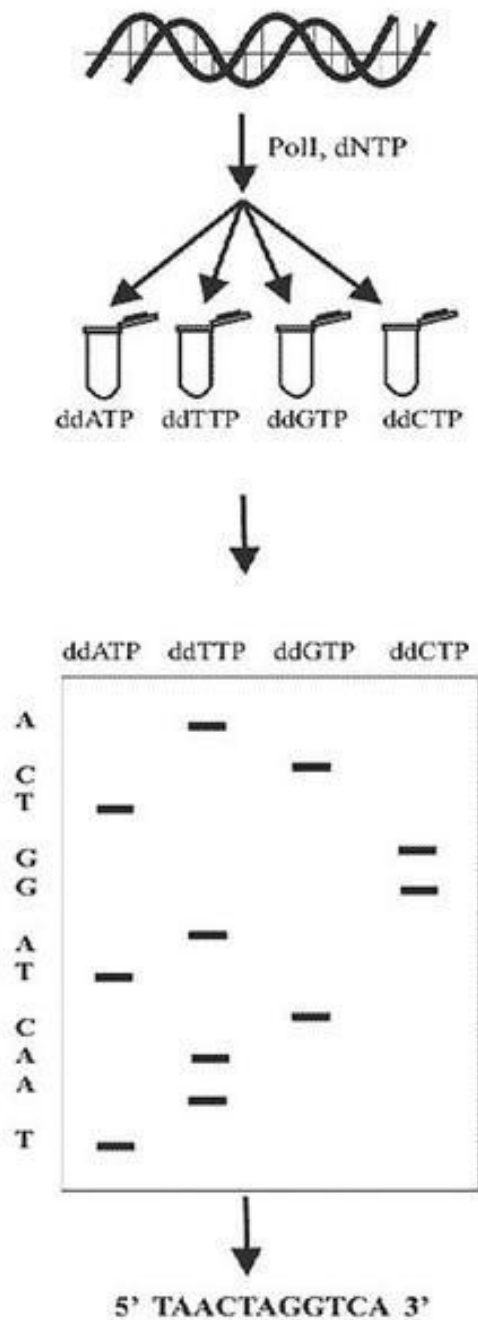
Метод «терминаторов»

dATP

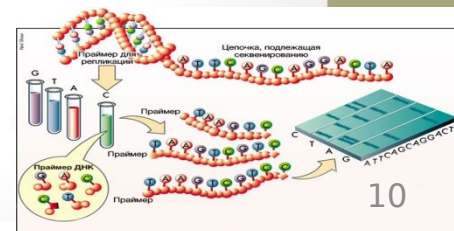


ddATP





- Раствор с праймером распределяют по четырём пробиркам, в каждой из которых находятся четыре дезоксинуклеотида, dATP, dCTP, dGTP и dTTP (один из них — меченный радиоактивным изотопом) и один из четырёх 2',3'-дидезоксинуклеотидов (ddATP, ddTTP, ddGTP или ddCTP). Дидезоксинуклеотид включается по всем позициям в смеси растущих цепей, и после его присоединения рост цепи сразу останавливается.
- В результате этого в каждой из четырёх пробирок при участии ДНК-полимеразы образуется уникальный набор олигонуклеотидов разной длины, включающих праймерную последовательность. Далее в пробирки добавляют формамид для расхождения цепей и проводят электрофорез в полиакриламидном геле на четырёх дорожках. Проводят радиоавтографию, которая позволяет «прочитать» нуклеотидную последовательность секвенируемого сегмента ДНК.



Секвенирование по Сэнгеру

Этапы:

выделение ДНК

подготовка «библиотеки»

амплификация (клонирование и ПЦР)

секвенирование «мечеными терминаторами»

Характеристики:

время работы несколько суток

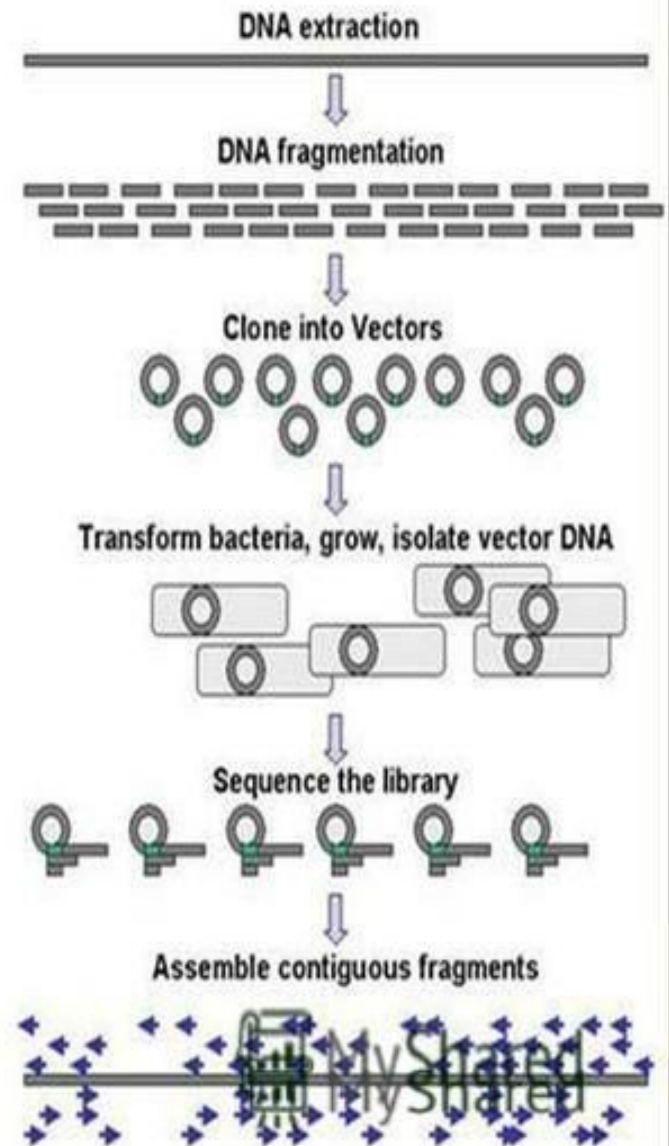
длина прочтения («рида») до 1000 п.н.

один рид за раз

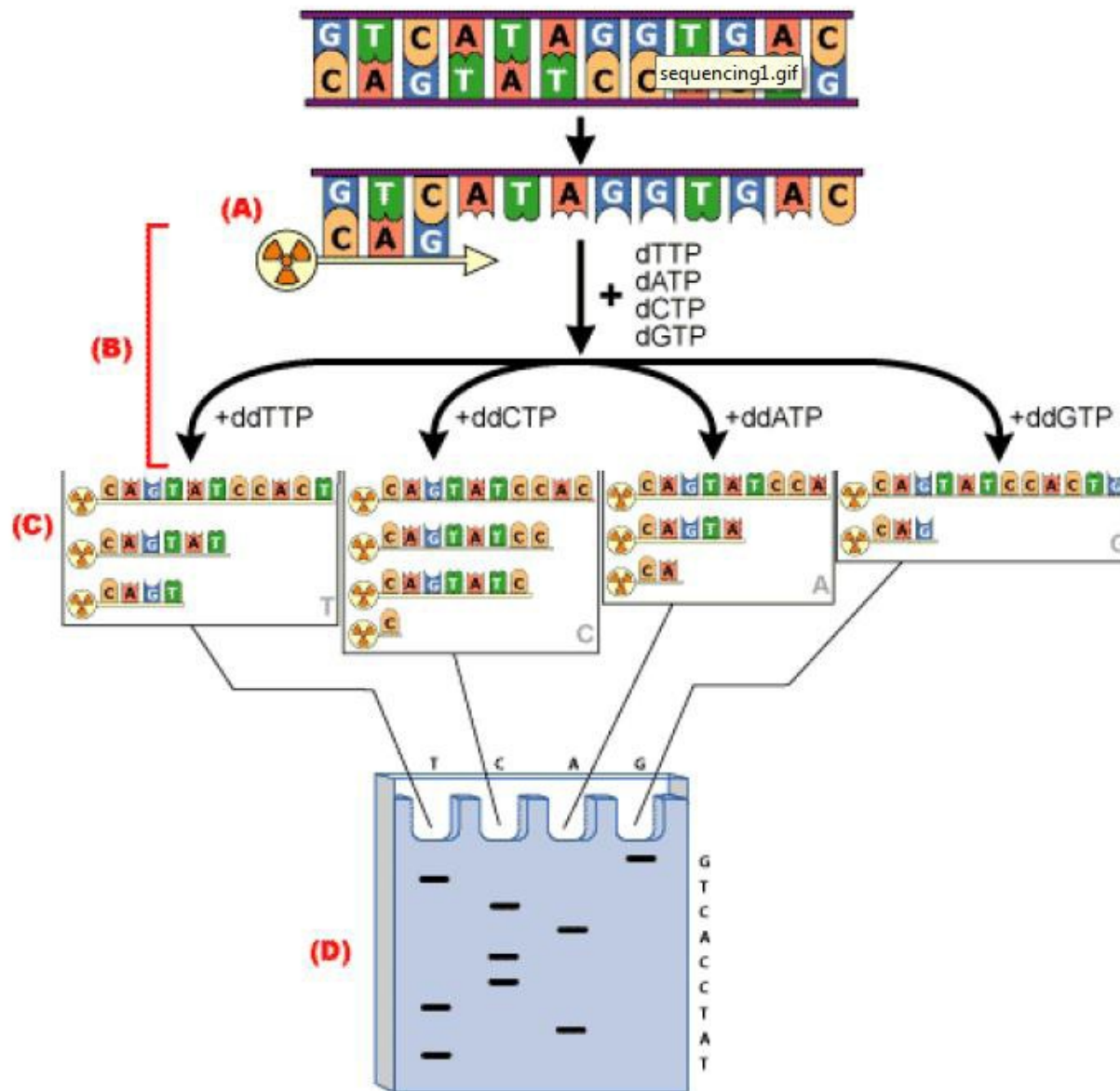
ошибки ~0,5%

Повторением части процедуры

(ПЦР+секвенирование) можно добиться ридов в несколько тысяч п.н. и почти исключить ошибки.



Метод «терминаторов»



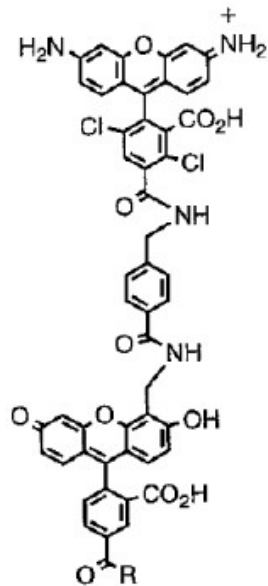
Метод «терминаторов»

- Можно заменить радиоактивную метку 4 флуоресцентными и ставить реакцию в одной пробирке
- Форез можно проводить в капилляре

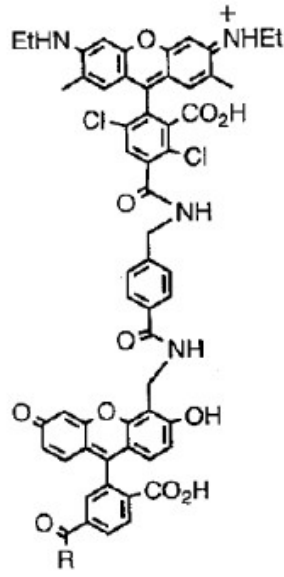


Applied Biosystems 3130

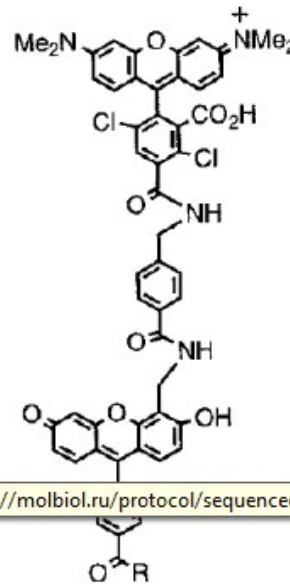
Applied Biosystems BigDye®



5CFB-dR110

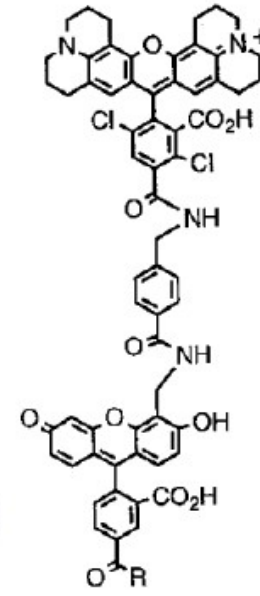


6CFB-dR6G

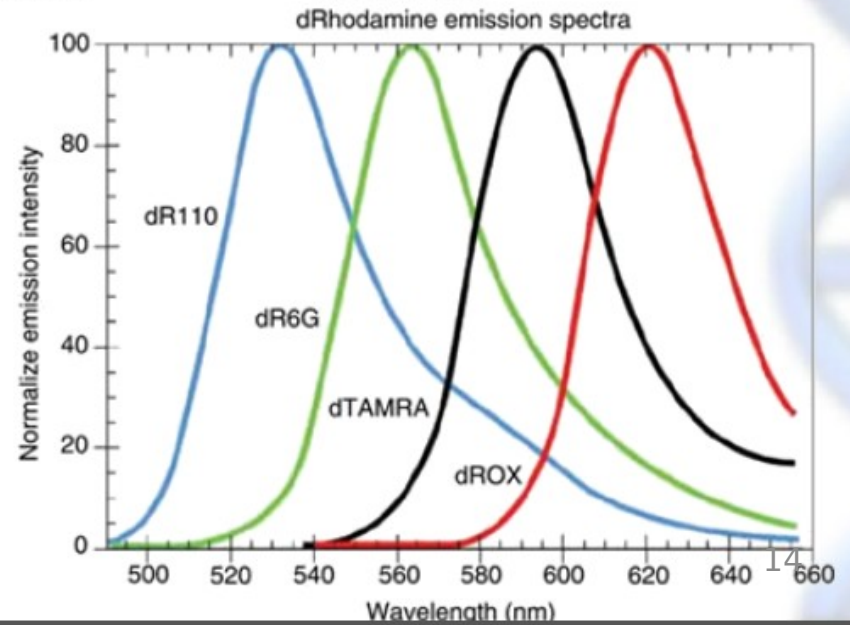


5CFB-dTMR

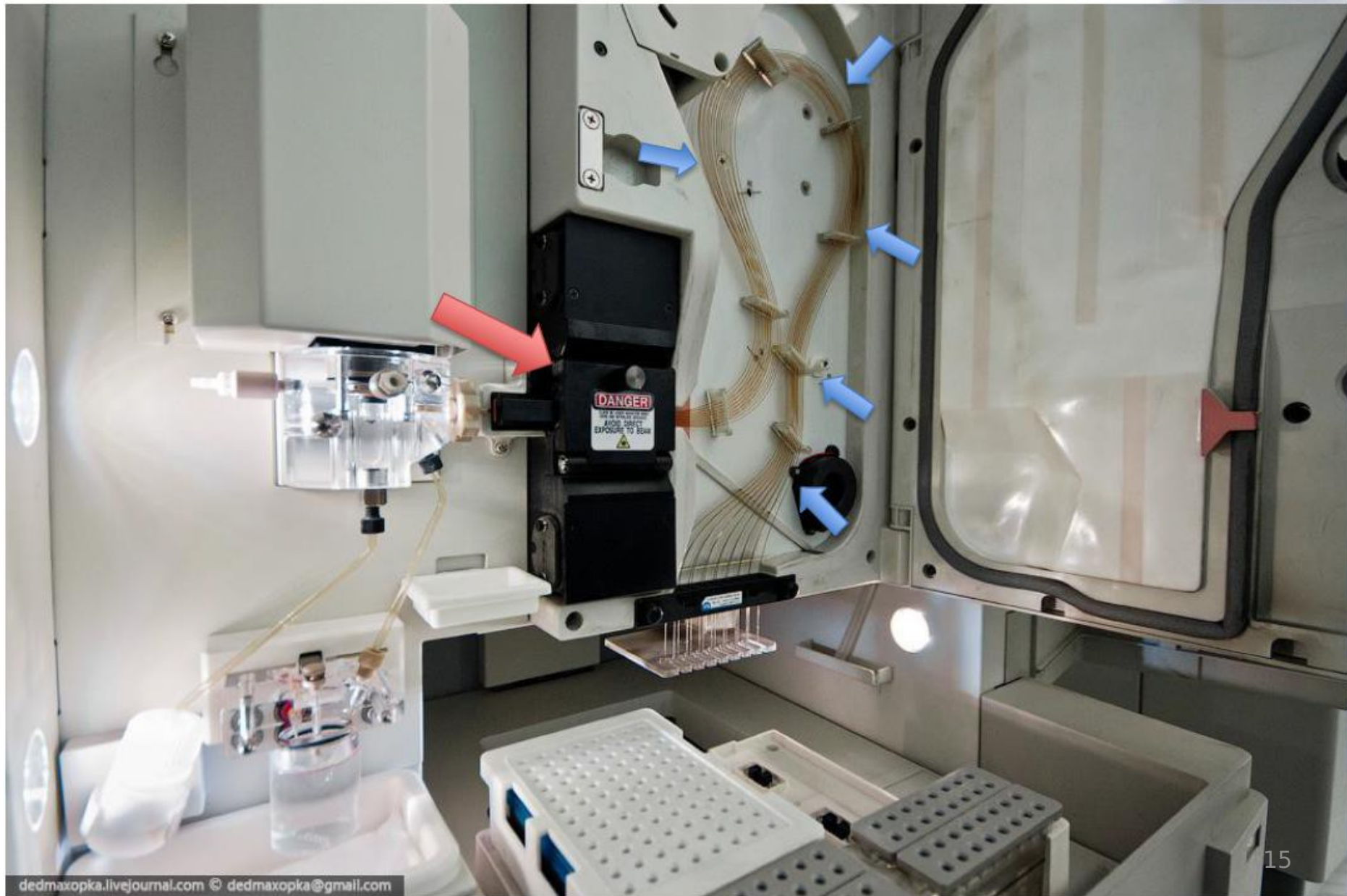
<http://molbiol.ru/protocol/sequenceob05.gif>



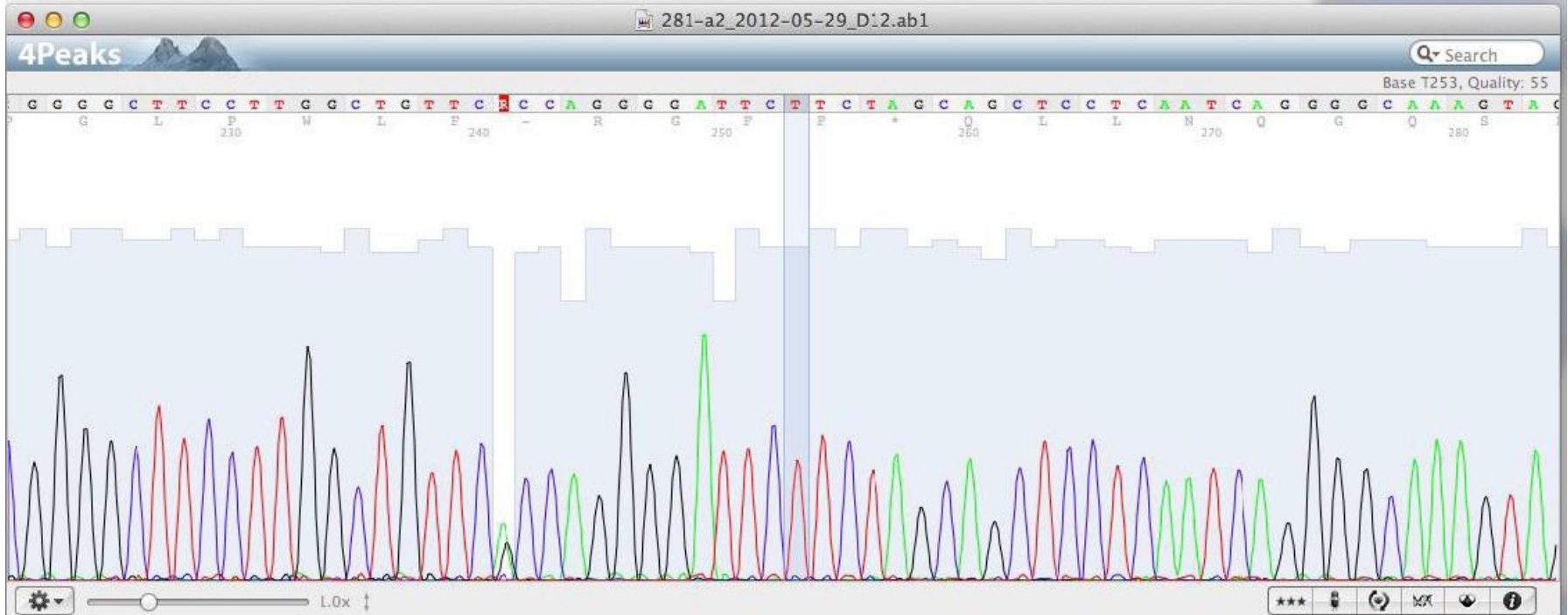
5CFB-dROX



Метод «терминаторов»

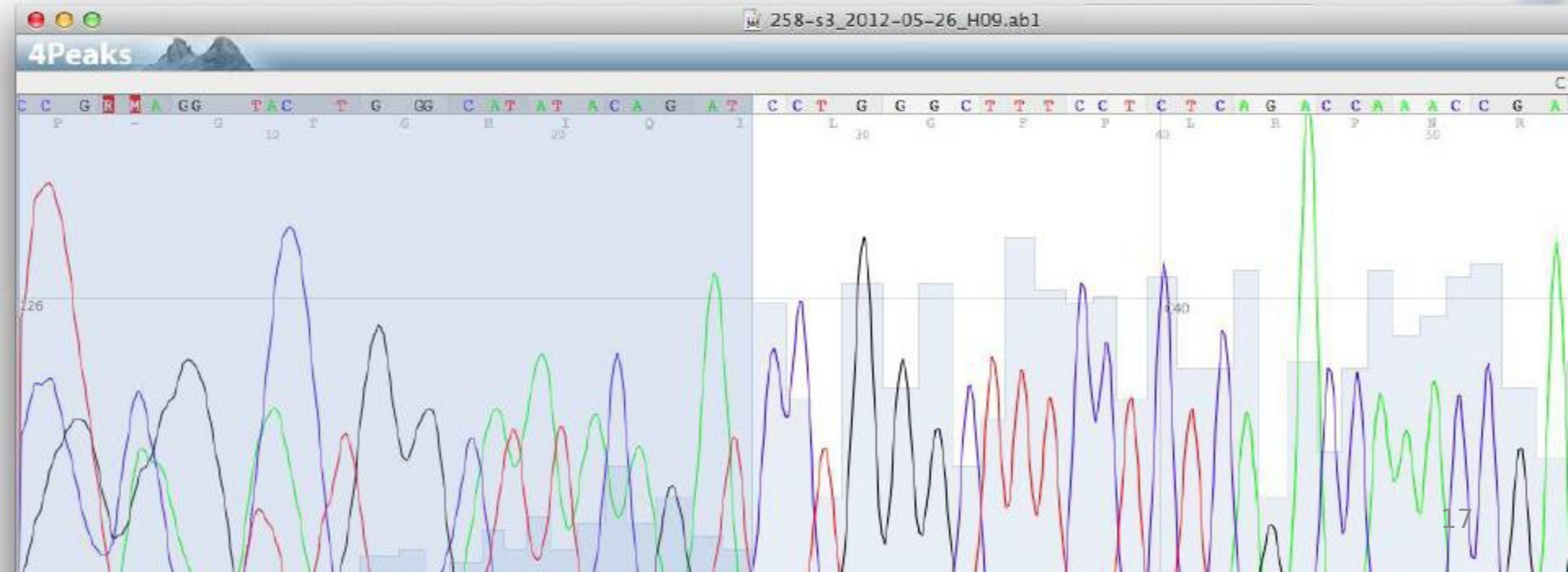


Метод «терминаторов»



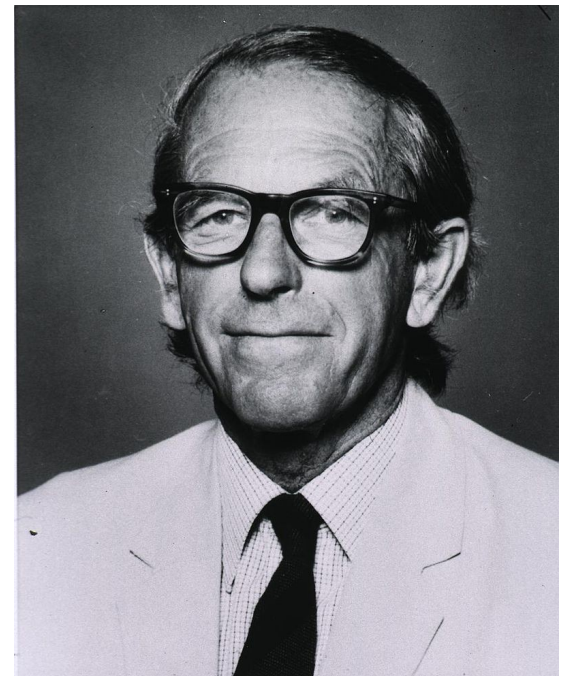
Недостатки

- Небольшая длина прочтения (900-1000 нуклеотидов)
- До 40 первых нуклеотидов не читаются



Фредерик Сенгер

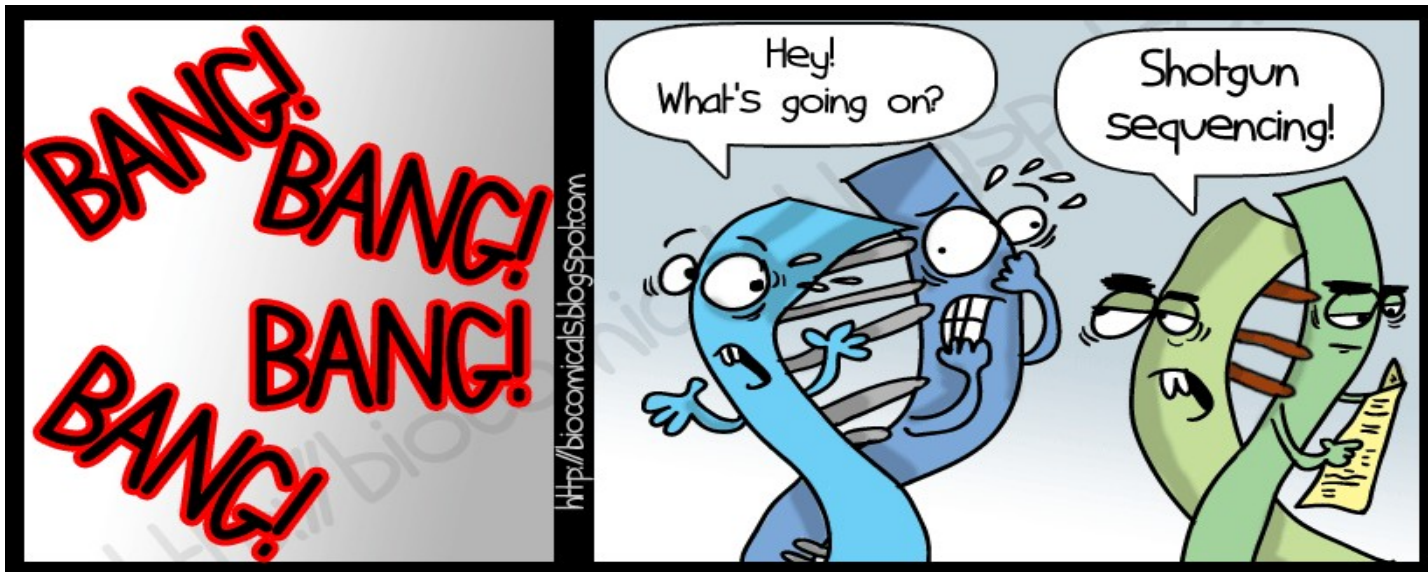
Английский биохимик, один из четырех человек, получивших две Нобелевские премии, единственный учёный в истории, получивший две Нобелевские премии по химии — в 1958 и 1980.



- Как отмечено в некрологе ученого, он считал себя «просто парнем, который возился в лаборатории», и «академически не выдающимся».
- Сенгер отклонил предложение получить рыцарское звание, потому что ему не хотелось, чтобы к нему обращались «Сэр». По этому поводу он сказал: «Рыцарское звание делает тебя особенным, не так ли? Но я не хочу быть особенным».
- В 1983 году, в возрасте 65 лет, Сенгер вышел в отставку и вернулся к себе домой. Ученый любил проводить время, работая в саду своего дома. Сенгер ушел из жизни во сне в возрасте 95 лет 19 ноября 2013 г.

Human Genome Project

- 1990-2003
- \$3.8 billion investment in HGP drove \$796 billion in economic impact, created jobs, and launched genomic revolution
- Метод: shotgun sequencing



2 December 1999

International weekly journal of science

nature

www.nature.com



The first human chromosome sequence

Climate change

Thermohaline trigger

Intermolecular energetics

Good vibrations

Impacts of foreseeable science

Supplement with this issue

New on the market
Lasers

IN THIS ISSUE NATURE REPORTS: BREAKTHROUGH IN CANCER

nature

SUBMITTING VOLCANOES

Are under water
strongly in danger

SEEKING AN ANSWER

First plants, now other

WHAT IS A GENE?

The simple questions
are the hardest

CANCER STEM CELL FUNCTION

How do they come from blood-stem cells?

NATURE JOBS
Announcements in research

“We each are like a different symphony orchestra”



All playing the same instruments slightly differently