

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ВОЛГОГРАДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Кафедра молекулярной биологии и генетики

РЕФЕРАТ

По теме: Методы микро- и макросеквенирования.

Подготовил:

Студент 3 курса 301 группы

По направлению «Биология»

Соколова Анастасия Витальевна

Волгоград

2021

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

В настоящее время нет ни одного метода секвенирования, который бы работал для молекулы ДНК целиком. Все они устроены так: сначала готовится большое число небольших участков ДНК (клонировается молекула ДНК многократно и «разрезается» её в случайных местах), а потом читается каждый участок по отдельности.

История

К концу 60-х годов XX века Ф.Сэнгером был разработан метод секвенирования РНК, получаемой с ДНК-матрицы при помощи РНК-полимеразы. В 1976 г. А. Максамом и У. Гилбертом был разработан метод секвенирования, основанный на специфической химической деградации фрагмента ДНК, радиоактивно меченного с одного конца.

Принцип комплементарности

Принцип комплементарности - это строгое соответствие азотистых оснований в ДНК, в котором аденин соединяется с тиминном двумя водородными связями (А=Т), а гуанин соединяется с цитозином тремя водородными связями (Г=Ц).

Такое взаимодействие играет ключевую роль в ряде фундаментальных процессов хранения и передачи генетической информации: репликации ДНК, обеспечивающей передачу генетической информации при делении клетки, транскрипции ДНК в РНК при биосинтезе белков, хранении генетической информации в двухцепочечной ДНК и процессах репарации ДНК при ее повреждении. Таким образом, принцип комплементарности лежит в основе различных взаимодействий, удвоения либо репликации молекул ДНК, по нему образуется дочерняя цепочка. При последующем делении материнской клетки каждая дочерняя получает по 1 копии молекулы ДНК. Многие методы

секвенирования ДНК основаны на взаимной комплементарности цепей этой молекулы. Этот принцип лежит в основе амплификации (см. ПЦР) целевых фрагментов ДНК и их последующего секвенирования.

Нуклеотидный состав ДНК подчиняется правилам Э. Чаргаффа:

1. Количество аденина (А) равно количеству тимина (Т), а количество гуанина (Г) - количеству цитозина (Ц):

$$A = T, G = C$$

2. Количество пуринов равно количеству пиримидинов:

$$A + G = T + C$$

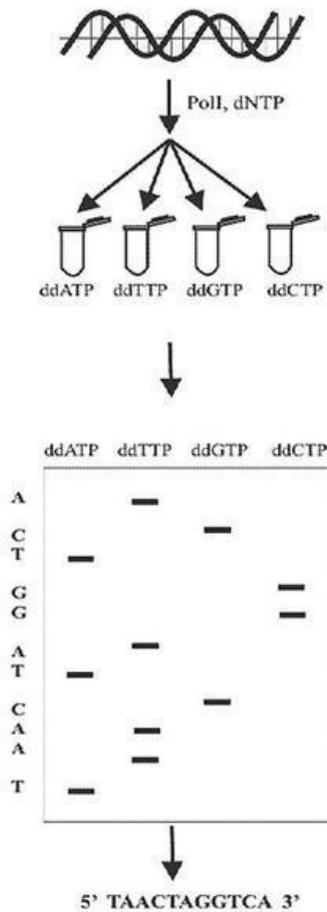
Нуклеотидный состав РНК подобным правилам не подчиняется.

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:

1. ДНК-полимераза, которая занимается репликацией,
2. праймеры, необходимые для начала процесса репликации,
3. смесь всех четырёх нуклеотидов, которые будут служить «кирпичиками» для строительства новых копий ДНК,

4. 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.



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.

Этапы Секвенирования

Секвенирование происходит в 3 этапа: 1. Выделение геномной ДНК, прочтение и создание библиотеки фрагментов; 2. Сборка; 3. Аннотация и анализ.

Для секвенирования необходимы количества порядка молекул. Главное знать размер полученных фрагментов, например, по методу дробовика. Полученные прочитанные фрагменты надо собрать в исходную последовательность. Исходная цепь восстанавливается благодаря тому, что у фрагментов, полученных от разных цепей, есть общие перекрывающиеся части. Для начала, из этих фрагментов нужно создать библиотеку набор из последовательностей длиной в 2–3 тыс. нуклеотидов. Для хорошего сигнала

во время секвенирования, надо много одинаковой ДНК в пробирке. Копии фрагментов получают путем их клонирования.

Секвенировать неизвестную последовательность можно двумя способами: можно отщеплять по одному нуклеотиду и определять каждый, но нужно следить, чтобы не отщеплялось по несколько букв. можно достраивать цепь ДНК.

Сейчас более распространен второй метод. Для него в реакционную смесь добавляют нуклеозид-трифосфаты (dNTP) и фермент, который будет по правилу комплементарности достраивать вторую цепь на матричной ДНК. Особенность метода в том, что в реакционную смесь добавляют дидезоксинуклеотиды (ddNTP: ddA, ddT, ddG, ddC). Если такой нуклеотид встроится в ДНК, то синтез цепи terminates. И так как дидезоксинуклеотиды встраиваются полимеразой случайно, в результате получится набор цепей ДНК разных длин.

Геном человека

Программа по секвенированию генома человека стартовала в 1990 году, это обошлось в 3,5 млрд USD. Методика заключалась в том, что сначала поделили хромосомы, потом сами хромосомы порезали на фрагменты по 10 тыс. п. н., их клонировали в одних бактериях, очистили один фрагмент от другого и раздробили на еще более мелкие куски, которые затем снова клонировали в *E.coli*, выделили, прочитали и склеили друг с другом. Крейг Вентер автор метода дробовика. Он считал, что не нужно кучу раз пересевать и клонировать куски ДНК, а можно просто разбить сразу на куски и потом их собрать. Крейг Вентер с помощью придуманного им метода занимался секвенированием параллельно с проектом Геном человека с 1999 года.

Отличия генома человека, полученного в 2001 и в 2003 годах: было закончено 99% ген-содержащих областей генома (а черновой 90%); точность не более 1 ошибки на 10 тыс. позиций (в ошибка на 1000); пробелов осталось 400, а было 150 тыс; размер самой длинной непрерывной строки 27 млн

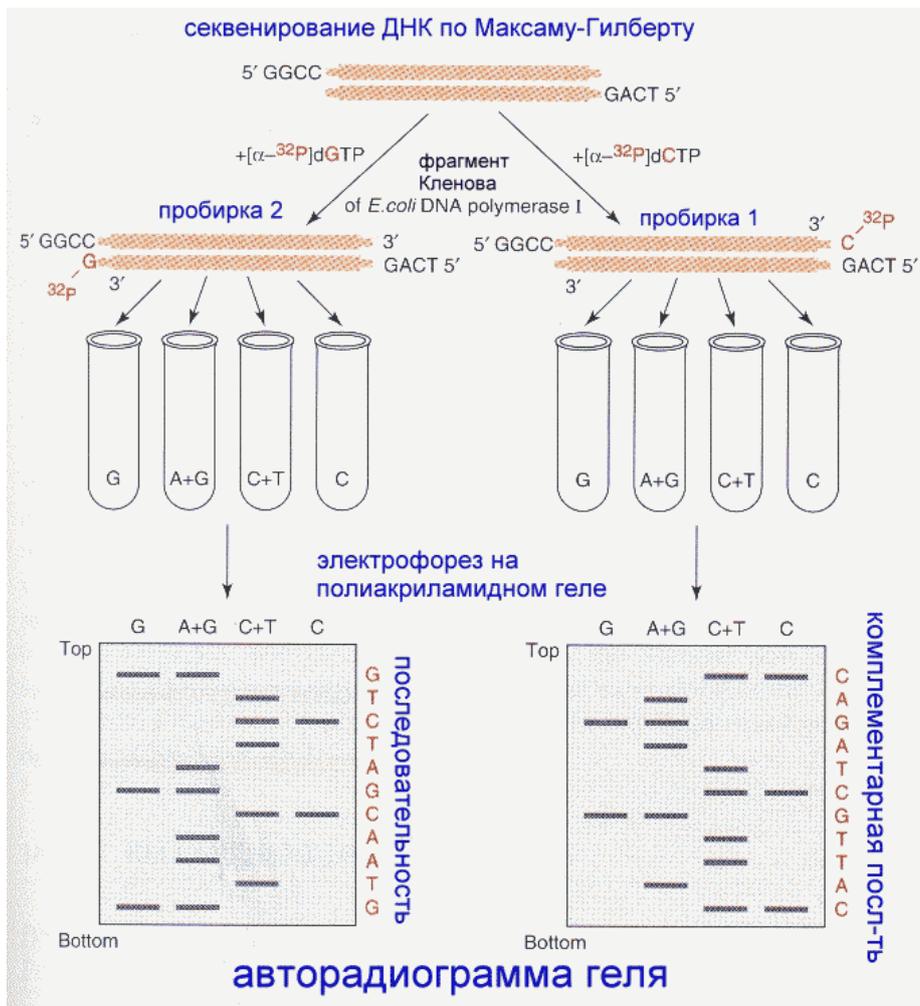
позиций (ранее около 80 тыс); оставшиеся 1,5% длины генома и 400 брешей будут закрываться вне рамок общемирового скоординированного проекта

Общие характеристики генома человека: длина ДНК в вытянутом состоянии почти 2 метра; число нуклеотидов примерно 3×10^9 ; число хромосом 23 (первая самая большая, последняя самая маленькая).

Секвенирование ДНК по Максаму и Гилберту: метод химической дегградации

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

Препарат меченой 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.



Автоматическое секвенирование ДНК

В основе автоматического секвенирования метод ферментативного секвенирования с использованием терминирующих ddNTP (*). Автоматическое секвенирование включает две стадии: проведение терминирующих реакций и разделение продуктов этих реакций с помощью электрофореза.

Методы секвенирования нового поколения- техника определения нуклеотидной последовательности ДНК и РНК для получения формального описания её первичной структуры. Технология методов секвенирования нового поколения (СНП) позволяет «прочитать» одновременно сразу несколько участков генома, что является главным отличием от более ранних методов секвенирования. СНП осуществляется с помощью повторяющихся циклов удлинения цепи, индуцированного полимеразой, или многократного

лигирования олигонуклеотидов. В ходе СНП могут генерироваться до сотен мегабар и гигабаз нуклеотидных последовательностей за один рабочий цикл.

Основные принципы всех методов СНП

Все основные принципы работы технологий СНП базируются на секвенировании ДНК-чипов, используя интерактивные циклические ферментативные реакции с дальнейшим сбором полученной информации в виде иллюстраций. Полученные данные используются для восстановления нуклеотидной последовательности или, как для технологии SOLiD, динуклеотидных «цветов». Несмотря на разные методы получения копий (амплификация) участков генома и на техническую разницу дифференциации различных нуклеотидов в прочтённых последовательностях, общая схема работы для всех секвенаторов одна.

СНП

I этап секвенирования создание библиотеки случайных последовательностей ДНК, которые можно будет сшить с общедоступными адаптерными последовательностями.

II этап создание ампликонов с помощью ПЦР, которые будут использованы как образцы.

III этап определение первичной структуры всех фрагментов.

Сравнение различных методов СНП

метод	принцип	длина одного прочтения, пар оснований	время работы за цикл	количество прочтений за цикл	преимущества	недостатки
454 Life Sciences	Пиросеквенирование	400	7 часов	1 млн.	длина прочтённых геномных участков; скорость	Высокая стоимость; погрешность
Illumina-SOLEXA	SBS (sequencing-by-synthesis)	300	9 дней	до 3 млрд.	эффективность, низкая стоимость	скорость
Ion-Torrent	ионный полупроводник	600	1,5 часа	до 5 млн.	низкая стоимость; скорость	погрешность
SOLiD	секвенирование на основе лигирования	35—50	9 дней	1,3 млрд.	низкая стоимость	скорость
Helicos	HeliScope	2900	1 час	35 000-75 000	длина прочтённых геномных участков; скорость	низкая производительность при желаемой малой погрешности; высокая стоимость

Список литературы:

1. <https://mipt.lectoriy.ru/file/synopsis/pdf/Biology-Bioinform-M04-Alekseev-121005.01.pdf>
2. Краснов Я.М., Гусева Н.П., Шарапова Н.А., Черкасов А.В. Современные методы секвенирования ДНК (обзор). *Проблемы особо опасных инфекций*. 2014;(2):73-79. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2014-2-73-79>
3. <http://www.myshared.ru/slide/1349992/>
4. <https://biomolecula.ru/articles/metody-v-kartinkakh-sekvenirovanie-nukleinovyx-kislot>