

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ

ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ВОЛГОГРАДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Кафедра молекулярной биологии и генетики

Тема: Методы микро- и макросеквенирования.

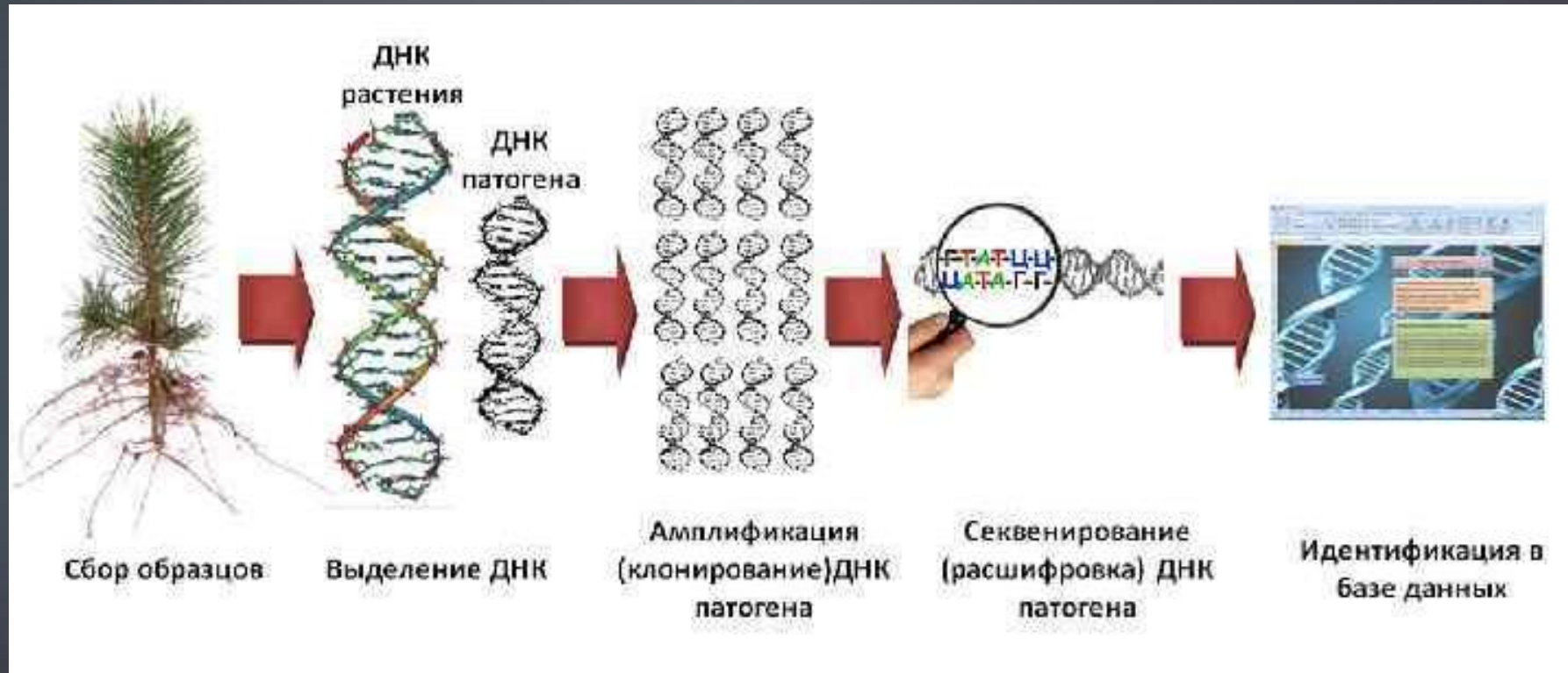
ПОДГОТОВИЛ:

СТУДЕНТ 3 КУРСА 301 ГРУППЫ

ПО НАПРАВЛЕНИЮ «БИОЛОГИЯ»

СОКОЛОВА АНАСТАСИЯ ВИТАЛЬЕВНА

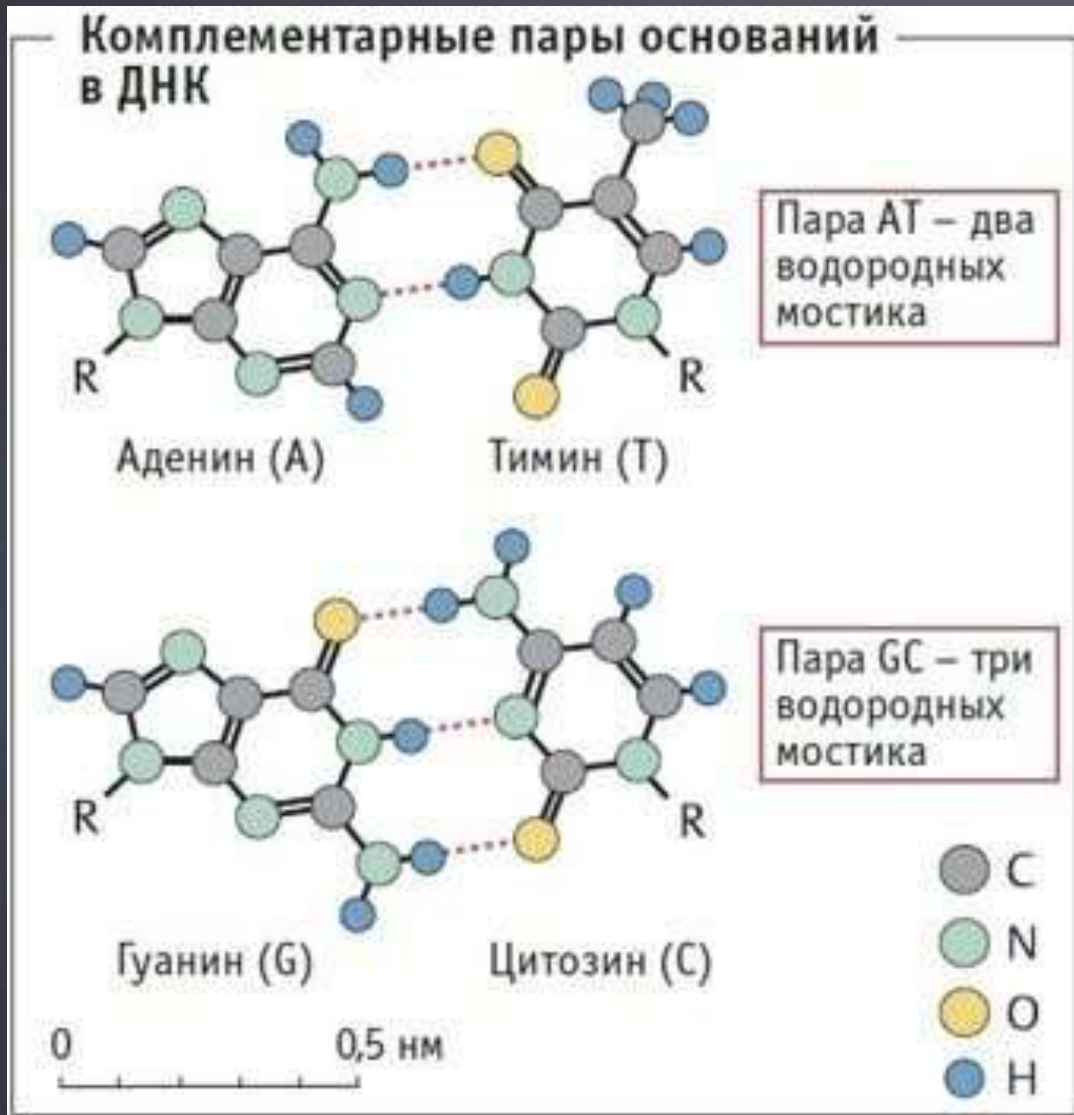
- ▶ Секвенирование биополимеров — определение их аминокислотной или нуклеотидной последовательности (от лат. *sequentum* — последовательность). В результате секвенирования получают последовательности участков генов, целых генов, тотальной мРНК и даже полных геномов организмов.



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)

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:

▶ $A + G = T + C$

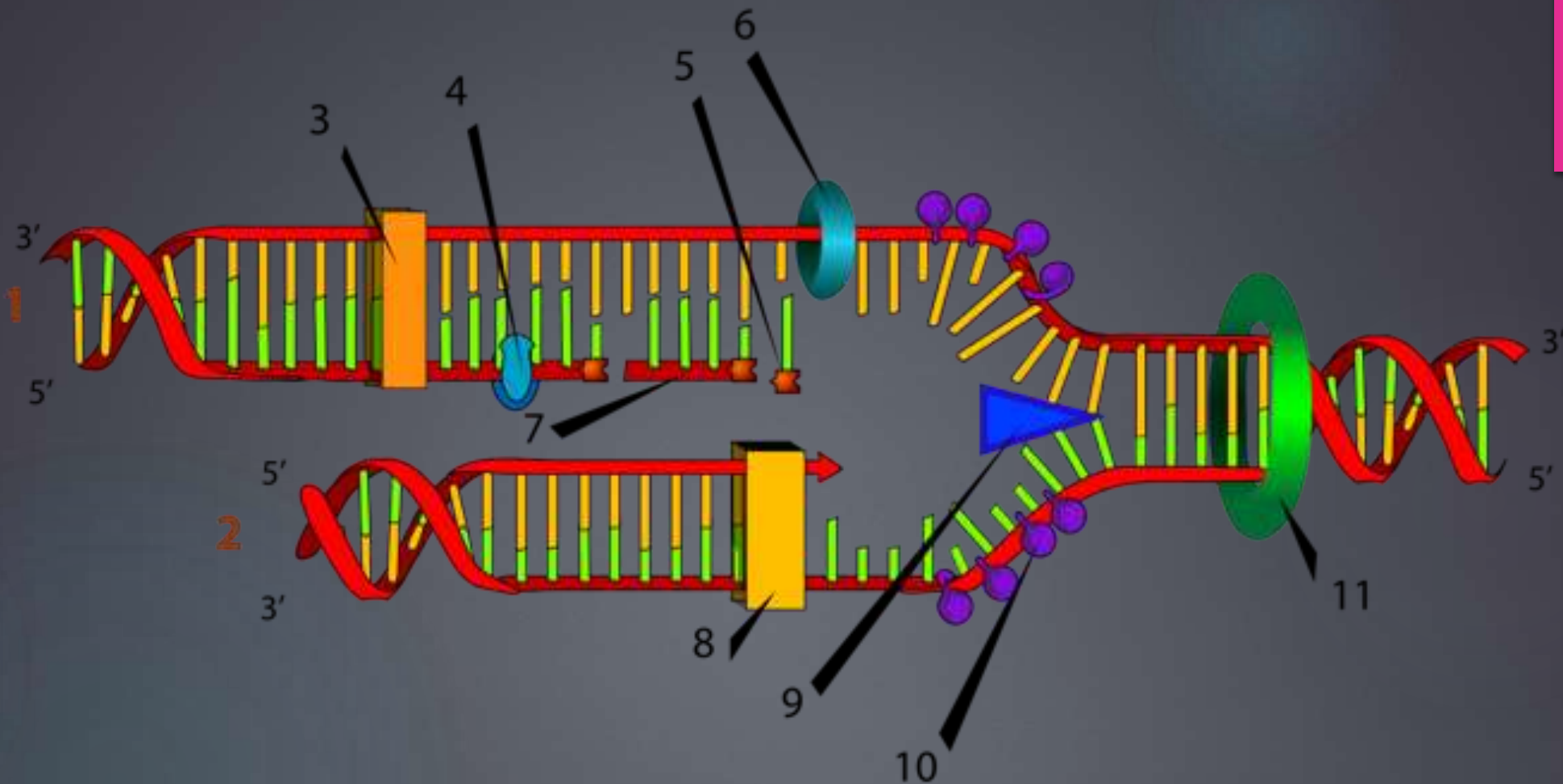
Нуклеотидный состав РНК подобным правилам не подчиняется.

Секвенирование по Сэнгеру

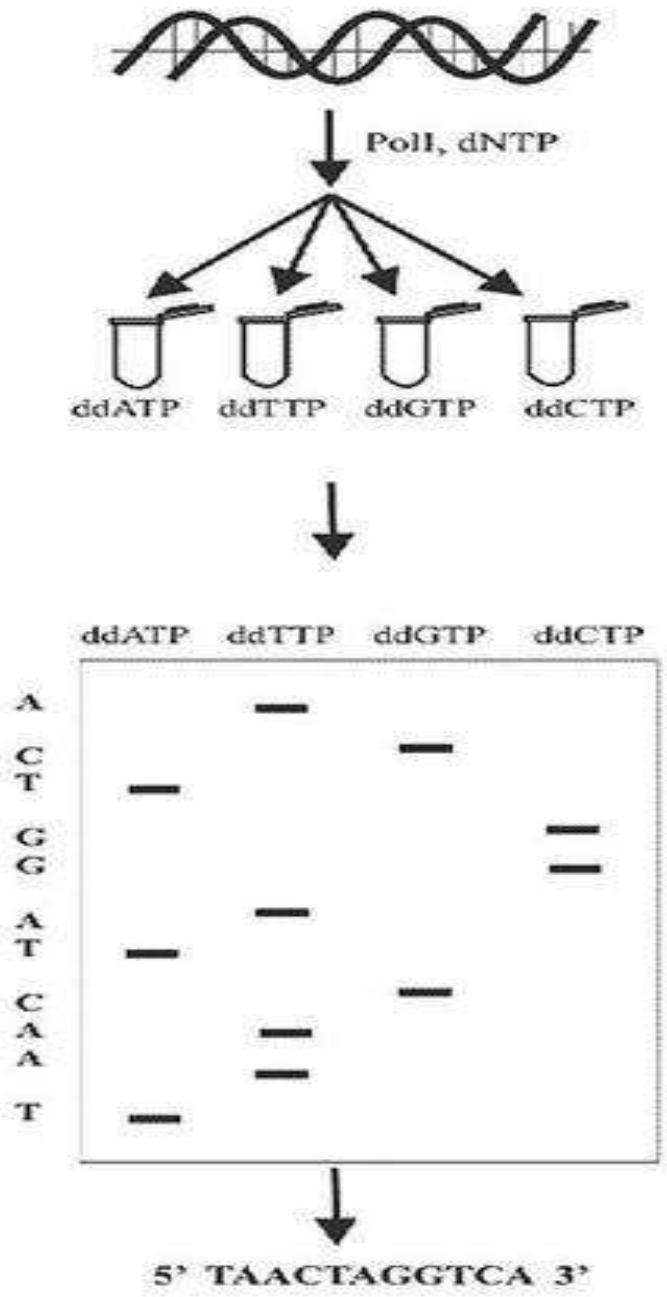
Участок ДНК клонируется, после чего полученная смесь делится на четыре части. Каждая часть помещается в активную среду, где присутствуют:

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.



- ▶ Схематическое изображение процесса репликации ДНК: (1) Отстающая цепь (запаздывающая нить), (2) Ведущая цепь (лидирующая нить), (3) ДНК-полимераза α (Pol α), (4) ДНК-лигаза, (5) РНК-праймер, (6) Праймаза, (7) Фрагмент Оказаки, (8) ДНК-полимераза δ (Pol δ), (9) Хеликаза, (10) Однонитевые ДНК-связывающие белки, (11) Топоизомераза.



► Раствор с праймером распределяют по **четырёх** 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.



Секвенировать неизвестную последовательность можно двумя способами:

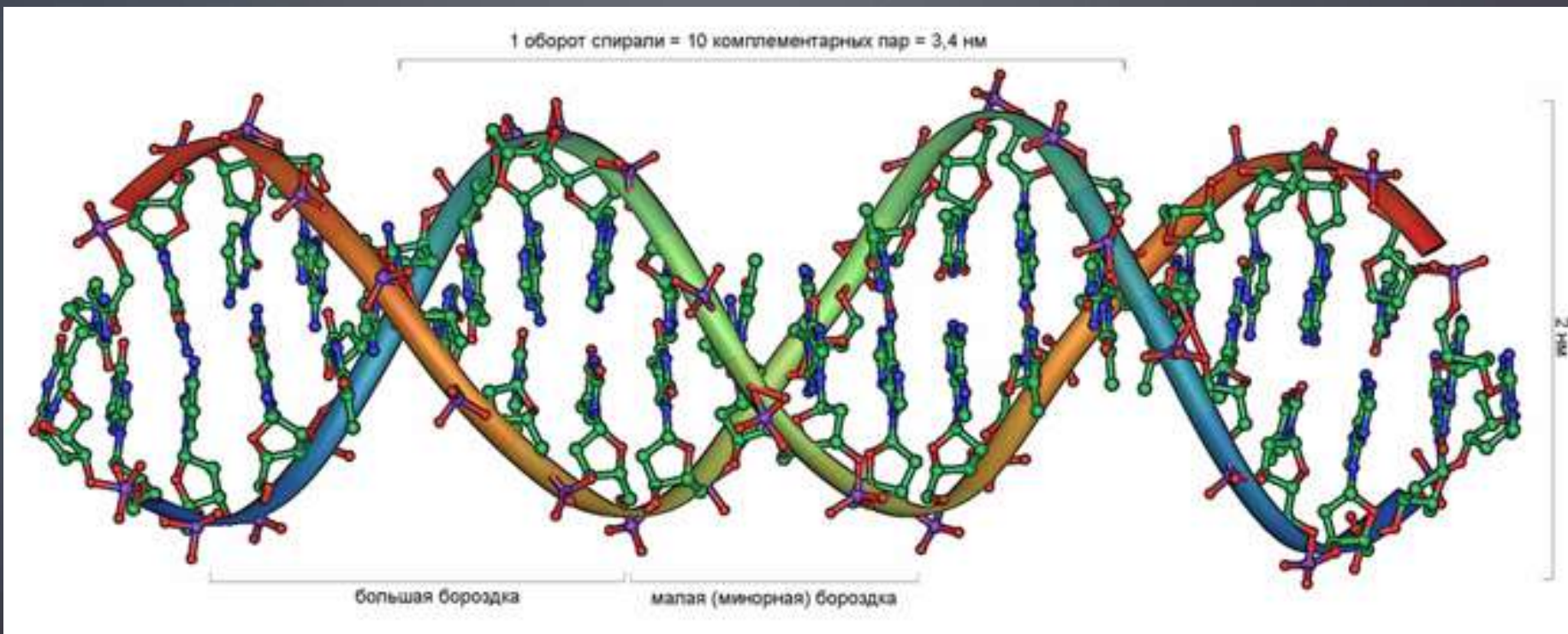
- ▶ можно отщеплять по одному нуклеотиду и определять каждый, но нужно следить, чтобы не отщеплялось по нескольку букв.
- ▶ можно достраивать цепь ДНК.

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.

Общие характеристики генома человека

- ▶ длина ДНК в вытянутом состоянии почти 2 метра; число нуклеотидов примерно $3 \cdot 10^9$; число хромосом 23 (первая самая большая, последняя самая маленькая).



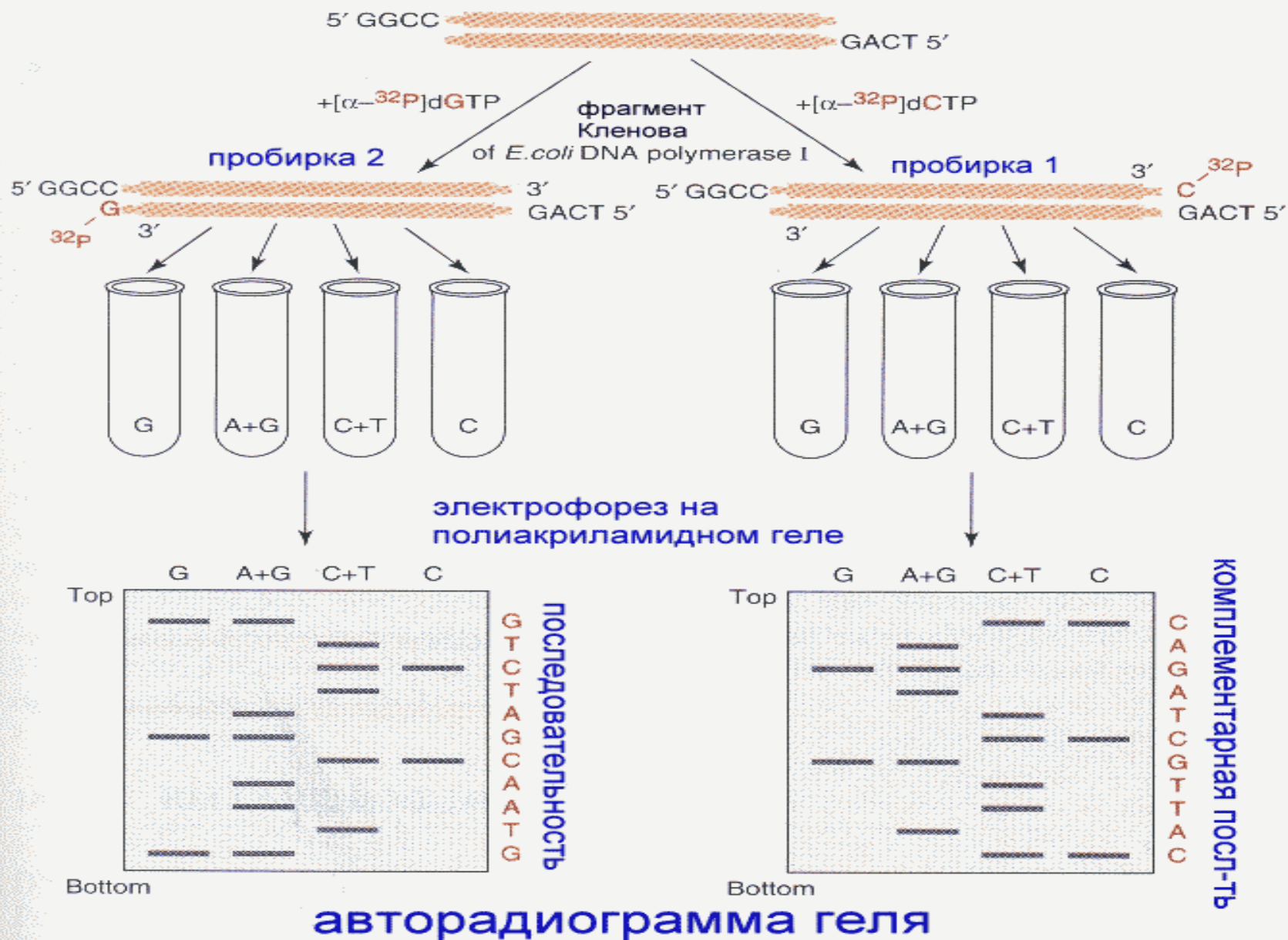
Секвенирование ДНК по Максаму и Гилберту: метод химической дегградации

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

Секвенирование ДНК по Максаму и Гилберту: метод химической дегградации

- ▶ 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.

секвенирование ДНК по Максему-Гилберту



Автоматическое секвенирование ДНК

В основе автоматического секвенирования метод ферментативного секвенирования с использованием терминирующих ddNTP (*).

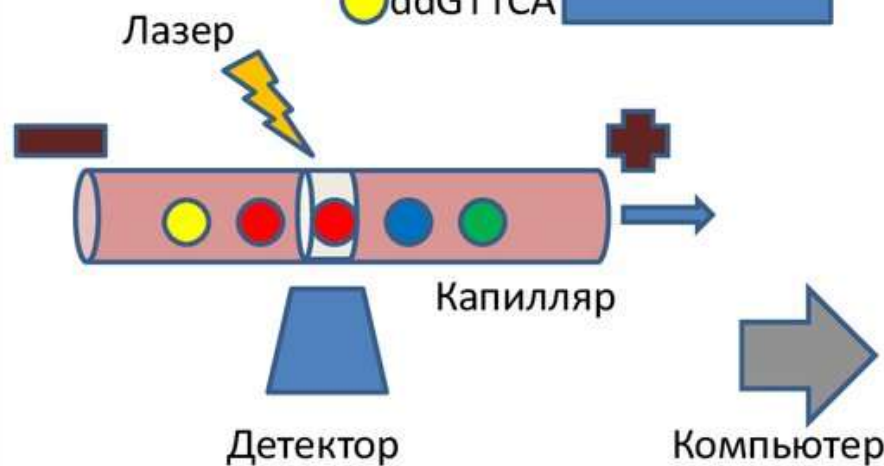
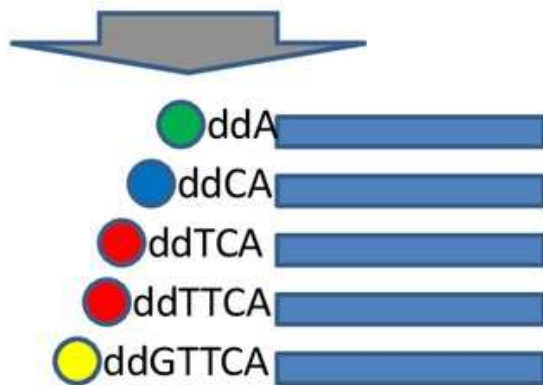
Автоматическое секвенирование включает две стадии:

- ▶ проведение терминирующих реакций
- ▶ разделение продуктов этих реакций с помощью электрофореза

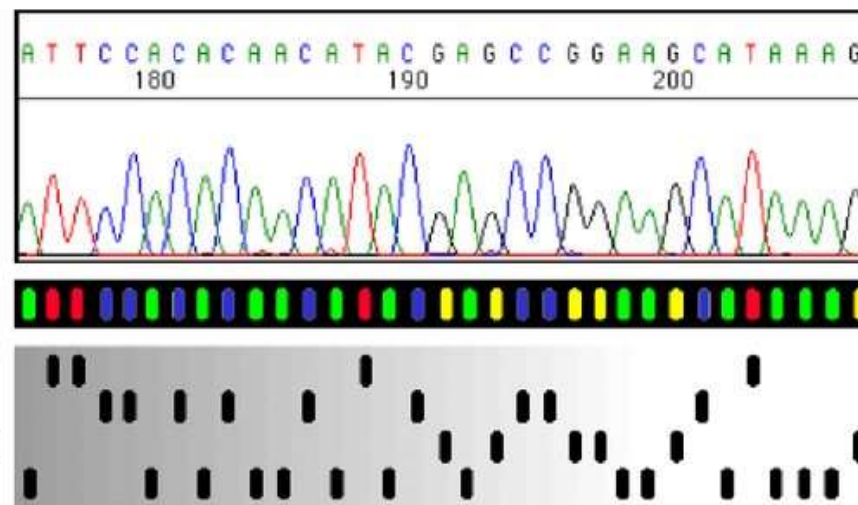
Автоматическое секвенирование

Реакционная смесь

dATP	ddATP
dTTP	ddTTP
dGTP	ddGTP
dCTP	ddCTP




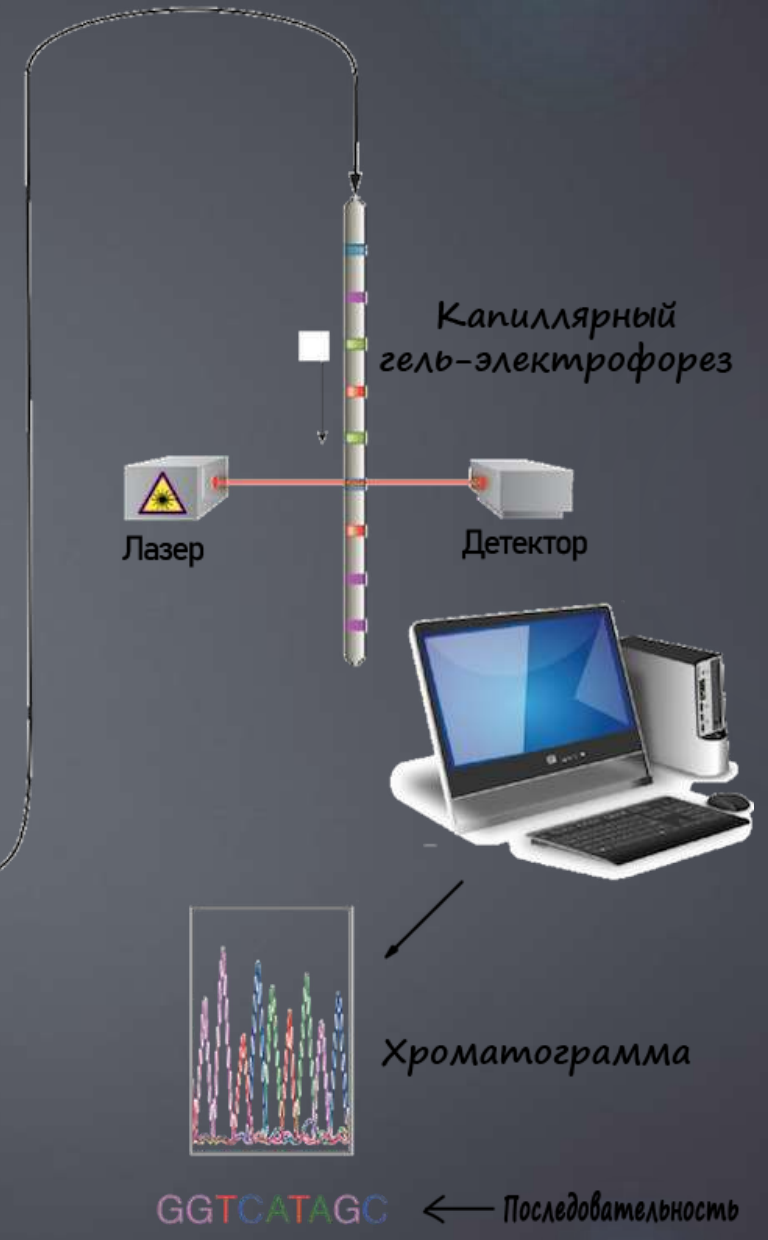
- Преимущества флуоресцентных меток над изотопными:**
1. Отсутствует радиоактивное загрязнение
 2. Меньшая трудоемкость
 3. Экономичность
 4. Автоматизация секвенирования



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.

- 
- ▶ 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