

# Секвенирование ДНК. Принципы и использование биоинформационного анализа.



Подготовили:  
Зданович Анна  
Закревская Татьяна

**Секвенирование** — определение нуклеотидной последовательности фрагмента ДНК путем получения серии комплементарных молекул ДНК, различающихся по длине на одно основание.

Размеры секвенируемых участков ДНК обычно не превышают 100 пар нуклеотидов; В результате секвенирования перекрывающихся участков ДНК, получают последовательности участков генов, целых генов, тотальной мРНК и даже полных геномов организмов;



# МЕТОДЫ СЕКВЕНИРОВАНИЯ

**по Сэнгеру**

(основан на синтезе изучаемой цепи ДНК *in vitro* с остановкой синтеза на заданном основании путем присоединения дидезоксинуклеотида)

метод "терминаторов"

**Автоматическое**

**по Максиму-Гилберту**

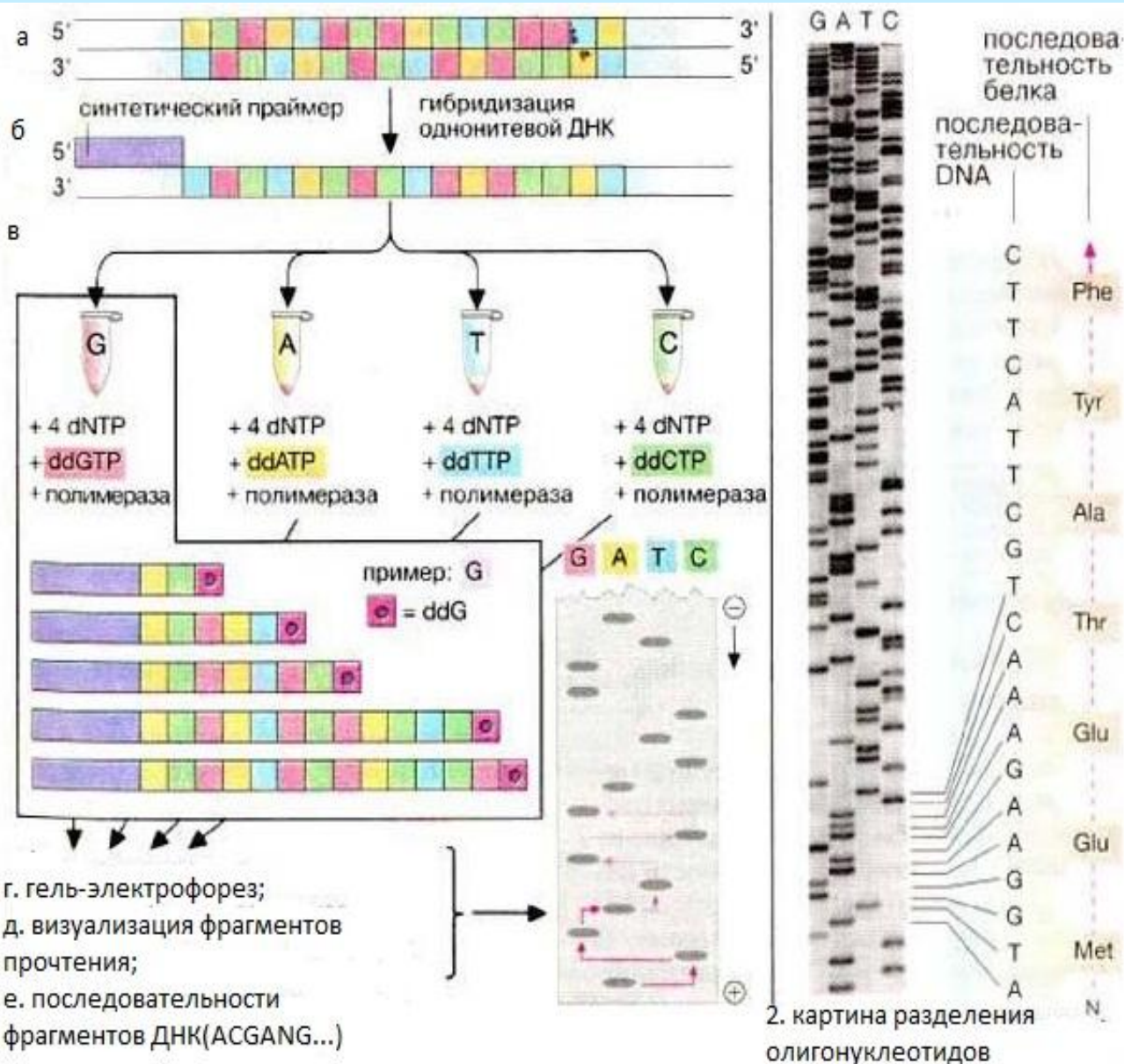
(основан на химическом расщеплении ДНК по одному основанию)

"плюс-минус" метод

# Метод Сэнгера или дидезоксисеквенирование

**Метод включает следующие этапы:**

- 1) гибридизация изучаемого фрагмента ДНК с праймером;
- 2) ферментативный синтез ДНК;
- 3) денатурация полученных продуктов формамидом (в результате образуются уникальные различающиеся по длине олигонуклеотидные последовательности, содержащие праймер);
- 4) электрофорез в полиакриламидном геле на четырех дорожках (по числу типов нуклеотидов);
- 5) анализ результатов на радиоавтографе.;



2. картина разделения олигонуклеотидов

# МЕТОД

Матрица - одноцепочечный фрагмент ДНК;

Праймер - синтетические олигонуклеотиды или природные субфрагменты;

Фермент - фрагмент Кленова ДНК полимеразы I из E.coli.;

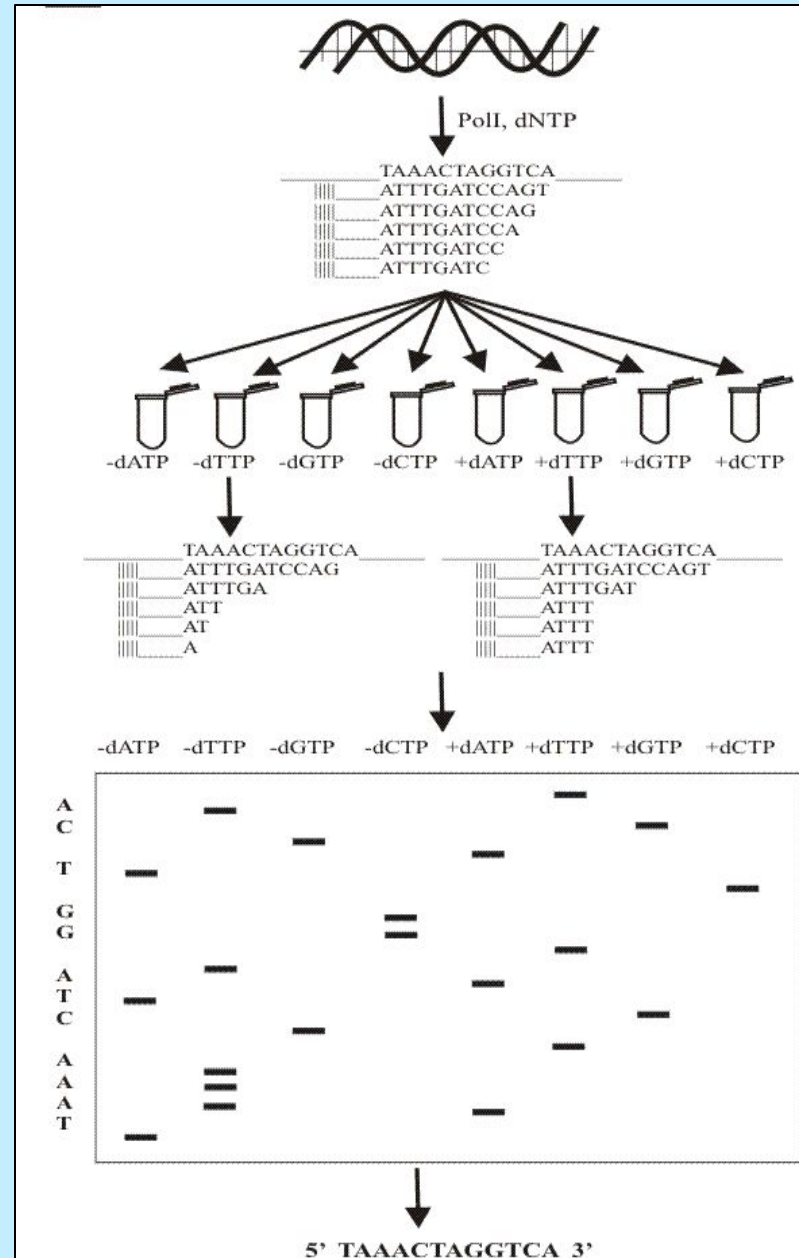
Метод включает два этапа:

1) полимеразная реакция в присутствии 4-х типов dNTP (1 из них был мечен по альфа-положению фосфата);

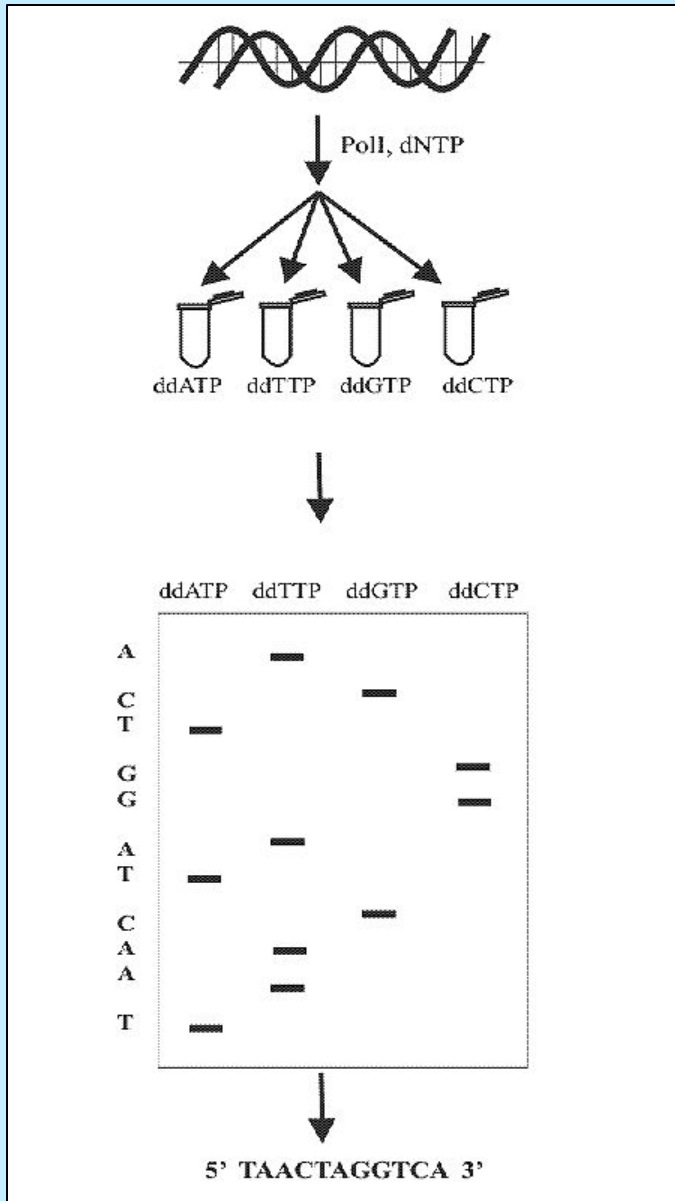
- в результате получали набор продуктов неполного копирования матричного фрагмента;

- смесь очищали от несвязавшихся дезоксинуклеозидтрифосфатов и делили на 8 частей. После чего в «+» системе проводили 4 реакции в присутствии каждого из 4-х типов нуклеотидов, а в «-» системе - в отсутствие каждого из них. В результате, в «-» системе терминация происходила перед dNTP данного типа, а в «+» системе - после него.

2) Полученные 8 образцов разделяли с помощью электрофореза, "считывали" сигнал и определяли последовательность исходной ДНК.



# Секвенирование ДНК по Сэнгеру: метод "терминаторов"



В основе метода лежит ферментативное копирование с помощью фрагмента Кленова ДНК полимеразы I из *E.coli*.

Праймер - синтетические олигонуклеотиды.

Помимо 4-х типов dNTP (один из которых был радиоактивно мечен по альфа положению фосфата) добавляли еще 1 из 2',3'-дидезоксинуклеозидтрифосфатов (ddATP, ddTTP, ddCTP или ddGTP), который способен включаться в растущую цепь ДНК, но не способен обеспечивать дальнейшее копирование из-за отсутствия 3'-ОН группы.

Отношение концентраций dNTP/ddNTP подбирали экспериментально.

Таким образом, для определения первичной структуры исследуемого фрагмента ДНК требовалось провести 4 р-ции копирования: по 1 типу терминаторов в каждой из реакций.

Полученные продукты разгонялись в полиакриламидном геле на соседних дорожках и по расположению полос определялась последовательность нуклеотидов.

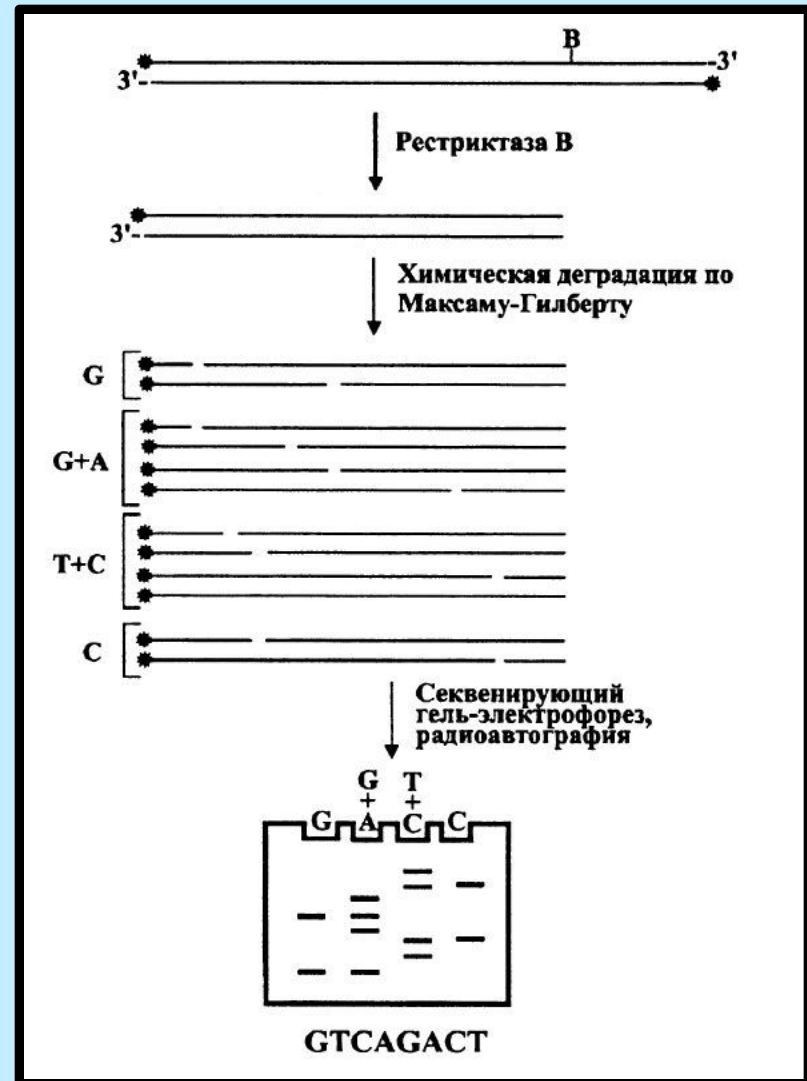
# Секвенирование ДНК по Максаму и Гилберту: метод химической дегградации

Основа метода - ограниченное расщепление меченого фрагмента ДНК под действием специфических реагентов.

Условие - наличие фрагмента ДНК, меченного только по одному концу.

В результате 4-6 типов реакций образуется смесь олигонуклеотидных молекул, несущих на одном из концов радиоактивную метку.

После разделения продуктов реакции в соседних дорожках полиакриламидного геля и этапа радиоавтографии на рентгеновской пленке видна лестница из полос ДНК, "чтение" которой позволяет восстановить последовательность нуклеотидов секвенируемого фрагмента ДНК.



# Автоматическое секвенирование ДНК

## 2 стадии:

- 1) проведение терминирующих реакций;
- 2) разделение продуктов реакций с помощью электрофореза.

Автоматическое секвенирование отличается от ручного секвенирования типом используемой метки.

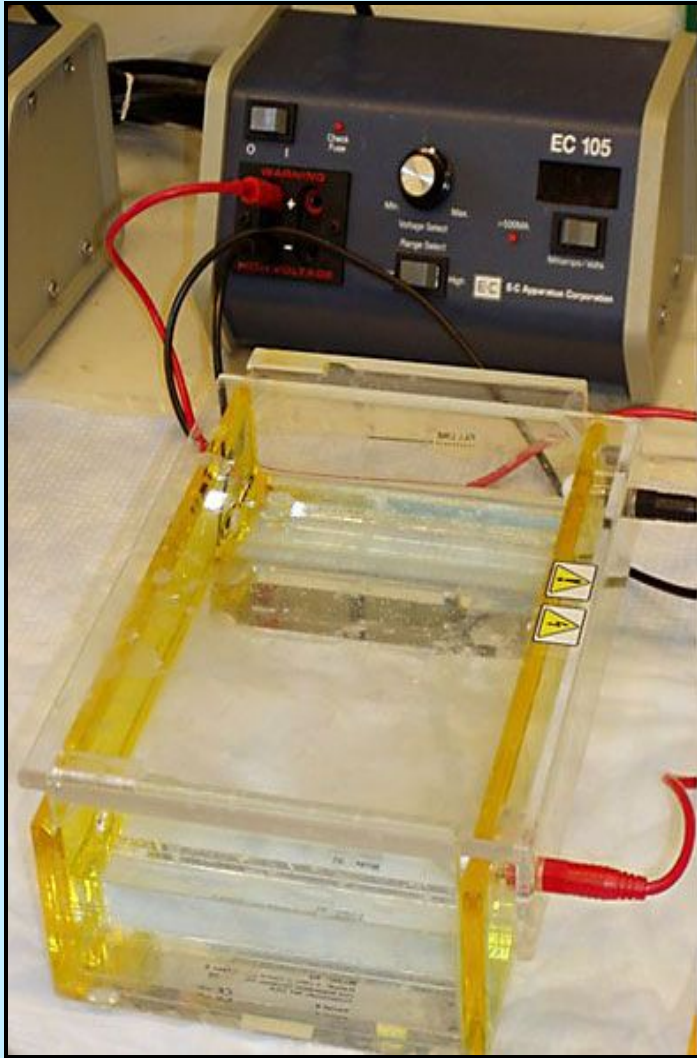
Флуоресцентную метку включают либо в праймер, либо в терминатор транскрипции



**Автоматический секвенатор**



# Секвенирующий гель и электрофорез



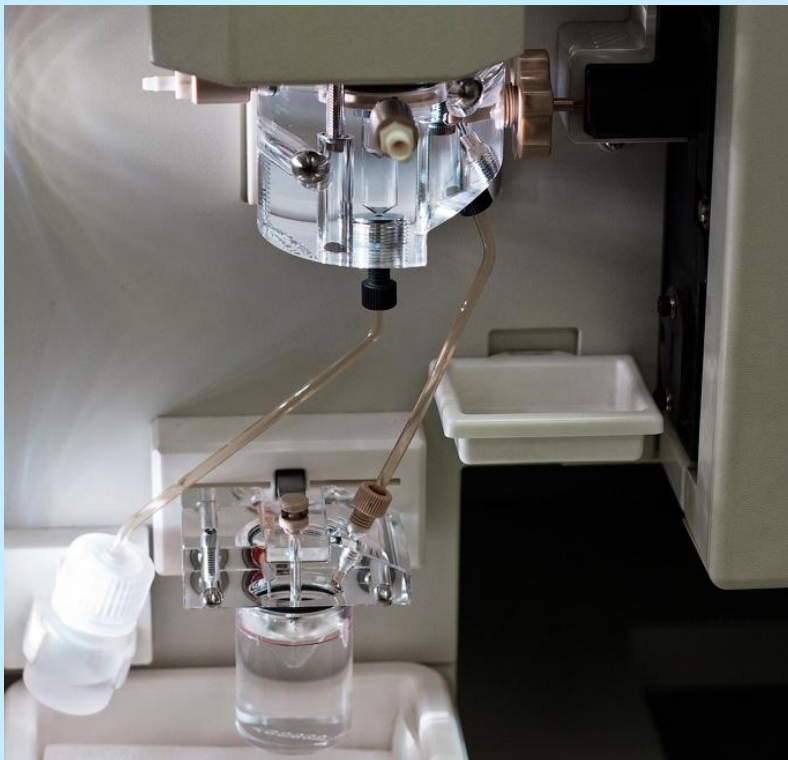
- Радиоактивно/флуоресцентно меченные одноцепочечные фрагменты ДНК разделяют с помощью электрофореза в полиакриламидном геле.
- Гели должны разделять фрагменты, отличающиеся друг от друга на один нуклеотид.
- Разделение должно проходить в денатурирующих условиях, препятствующих ренатурации и возникновению вторичных структур у разделяемых фрагментов. В общем случае этим требованиям удовлетворяют 5-8% полиакриламидные гели, содержащие 7М мочевины.
- Важным условием при проведении э/ф является однородность температуры по всей поверхности геля.

# СЕКВЕНАТОРЫ (по типу электрофореза)

капиллярные

с помощью гелевых пластинок

(различаются по количеству красителей: 1, 2 или 4)



- **Биоинформатика** — это область науки, разрабатывающая и применяющая вычислительные алгоритмы для систематизации и анализа генетической информации с целью определения молекулярных основ биологических процессов с последующим использованием этих знаний на практике.
- Под биоинформатикой понимают любое использование компьютеров для обработки биологической информации.
- В биоинформатике используются методы прикладной математики, статистики и информатики, а также она используется в биохимии, биофизике, экологии и в других областях.

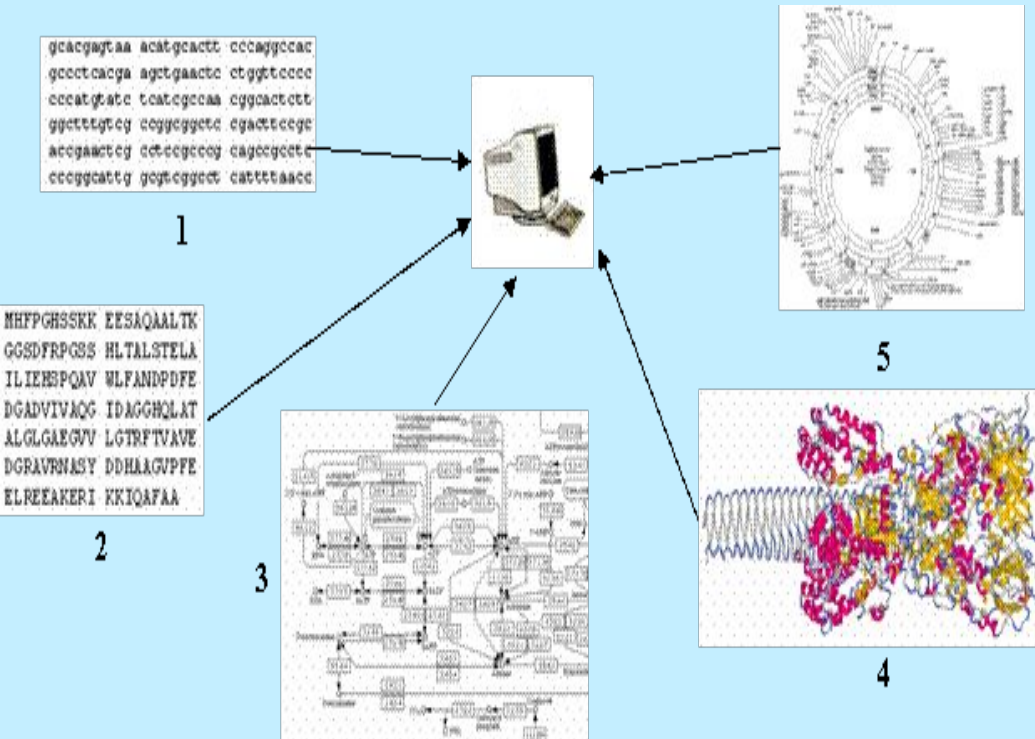
Существуют хранилища любой информации – **банки данных.**

## **Функции БД:**

- хранение;
- систематизация;
- обновление информации;
- обеспечение доступа к ней.

## **Известны разные БД:**

- 1 - хранят нуклеотидные последовательности генов;
- 2 – аминокислотные последовательности белков;
- 3 – метаболические карты передачи сигналов, либо взаимного превращения веществ в клетке;
- 4 - содержат данные о трехмерном строении молекул;
- 5 – генетические карты хромосом ;



## **Исследовательские цели биоинформатики:**

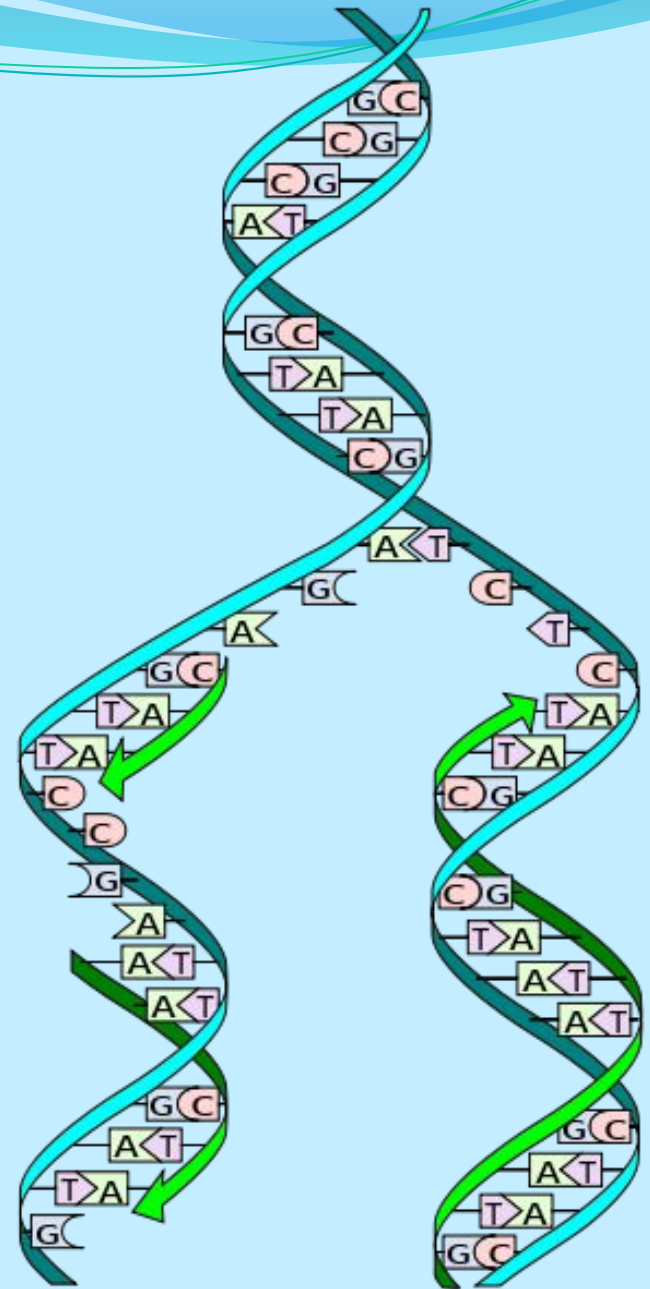
1. Анализ геномов, поиск в них генов.
2. Предсказание функции генов.
3. Оценка роли отдельных участков последовательности в функционировании белка.
4. Построение молекулярных моделей белков на основе их последовательностей.
5. Исследование механизма функционирования макромолекул, исходя из их моделей.

***Одной из важнейших задач биоинформатики является обработка данных, получаемых при секвенировании.***

В течение многих лет последовательности ДНК были расшифрованы и сохранены в БД.

Со временем вручную стало невозможным анализировать такое количество информации, поэтому в наши дни используются компьютерные программы, которые сопоставляют (выравнивают) похожие последовательности ДНК в геномах разных видов. Один из вариантов такого выравнивания применяется при процессе **секвенирования**, так называемая техника «дробного секвенирования»

Этот метод быстро даёт результаты секвенирования, но сборка фрагментов является довольно сложной задачей для больших геномов.



# Вычислительная эволюционная биология

Эволюционная биология исследует происхождение и появление видов и их развитие с течением времени. Информатика помогает эволюционным биологам в нескольких аспектах:

1. изучать эволюцию большого числа организмов, измеряя изменения в их ДНК, а не только в строении или физиологии;
2. сравнивать целые геномы;
3. строить компьютерные модели популяций, чтобы предсказать поведение системы во времени;
4. отслеживать появление публикаций, содержащих информацию о большом количестве видов.

# Где используются достижения биоинформатики?





A 3D molecular model of a DNA double helix is shown against a dark blue background. The two strands of the DNA are represented by thick, yellow ribbons that twist around each other. The base pairs are shown as smaller, ball-and-stick models connecting the two strands. The atoms in these models are colored: carbon is grey, oxygen is red, nitrogen is blue, and hydrogen is white. The overall structure is a right-handed helix. Overlaid on the center of the DNA is the Russian text "Спасибо за внимание!!!", which translates to "Thank you for attention!!!". The text is in a bold, yellow, serif font and is underlined with a thick yellow line.

Спасибо за  
внимание!!!