

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

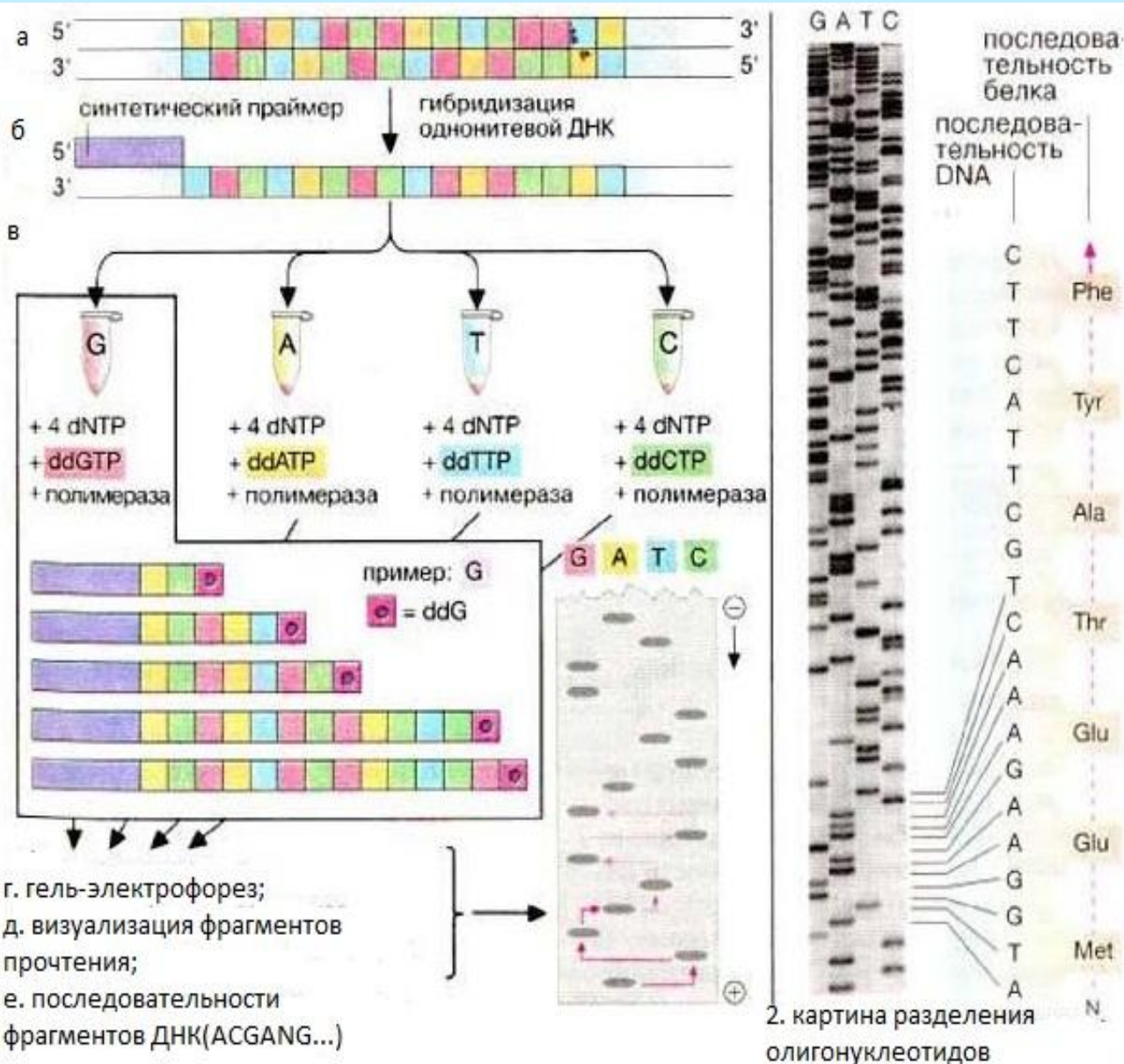
(основан на химическом расщеплении ДНК по одному основанию)

"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.;

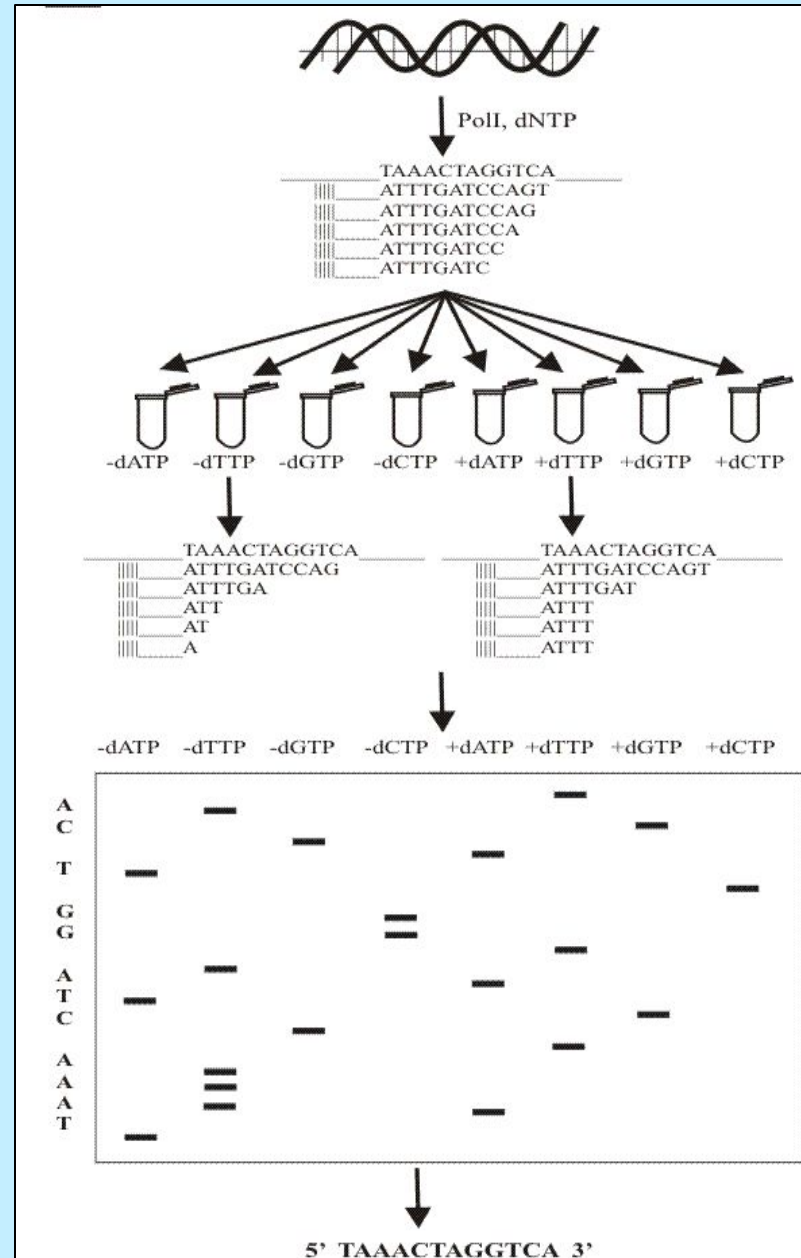
Метод включает два этапа:

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

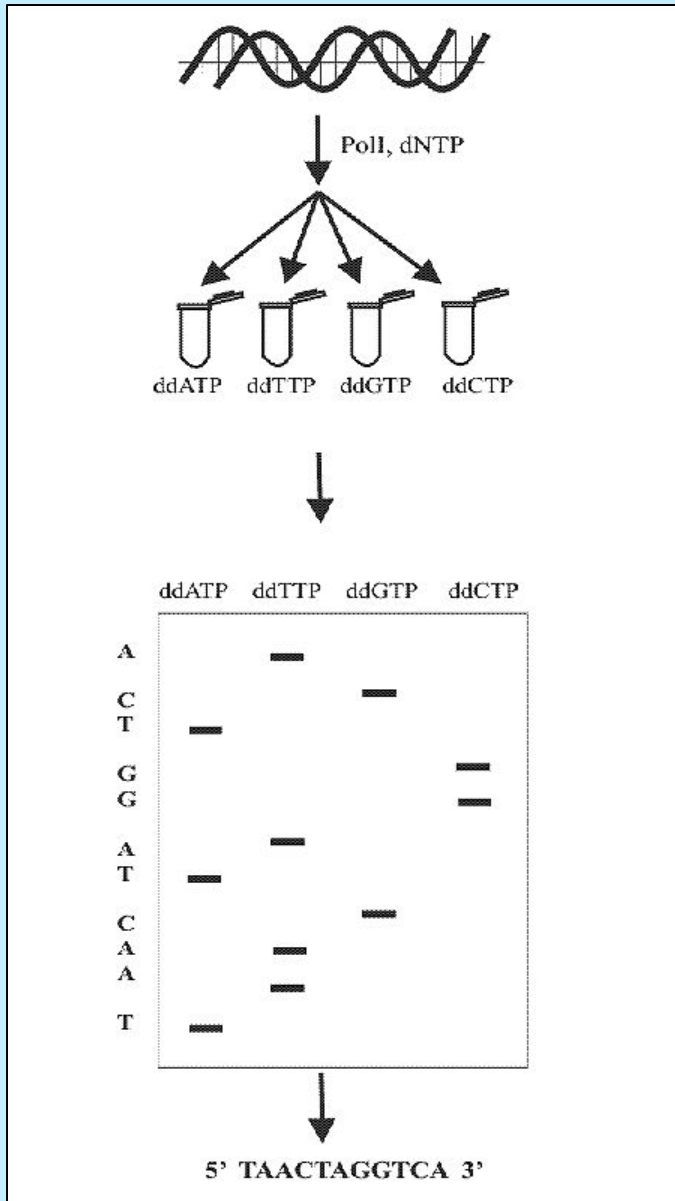
- в результате получали набор продуктов неполного копирования матричного фрагмента;

- 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.

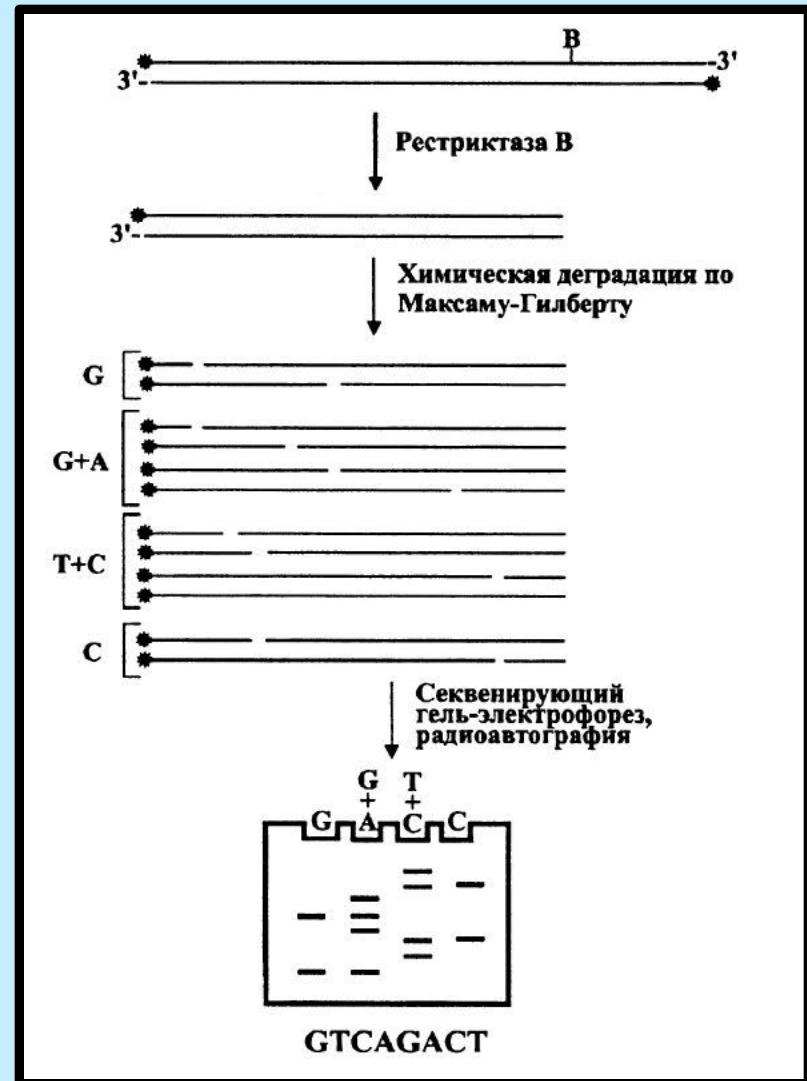
Секвенирование ДНК по Максому и Гилберту: метод химической дегградации

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.

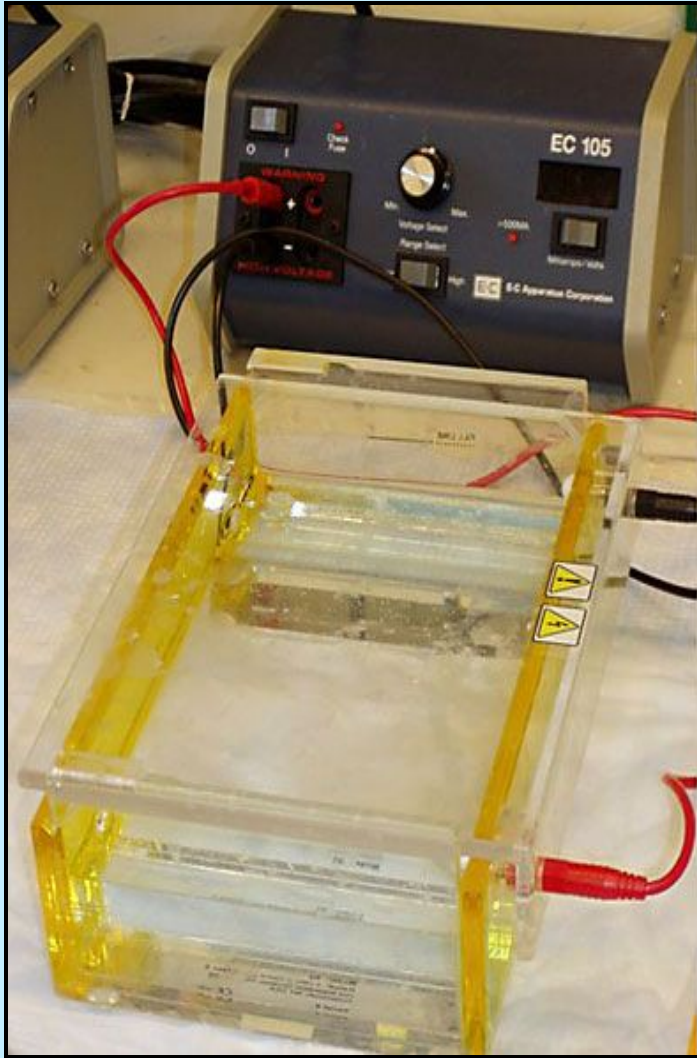
Автоматическое секвенирование отличается от ручного секвенирования типом используемой метки.

Флуоресцентную метку включают либо в праймер, либо в терминатор транскрипции



Автоматический секвенатор

Секвенирующий гель и электрофорез



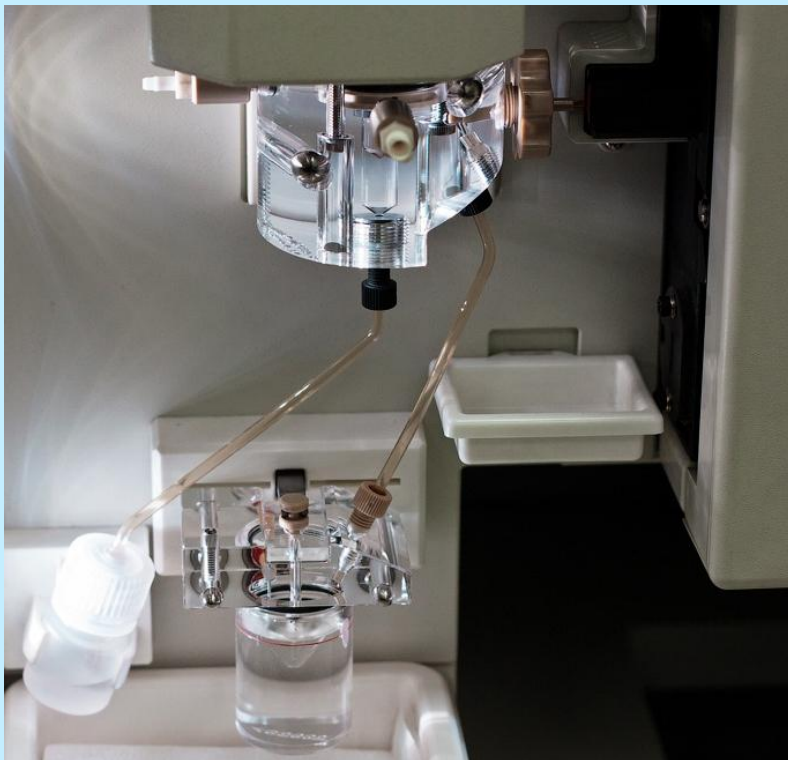
- Радиоактивно/флуоресцентно меченные одноцепочечные фрагменты ДНК разделяют с помощью электрофореза в полиакриламидном геле.
- Гели должны разделять фрагменты, отличающиеся друг от друга на один нуклеотид.
- Разделение должно проходить в денатурирующих условиях, препятствующих ренатурации и возникновению 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.

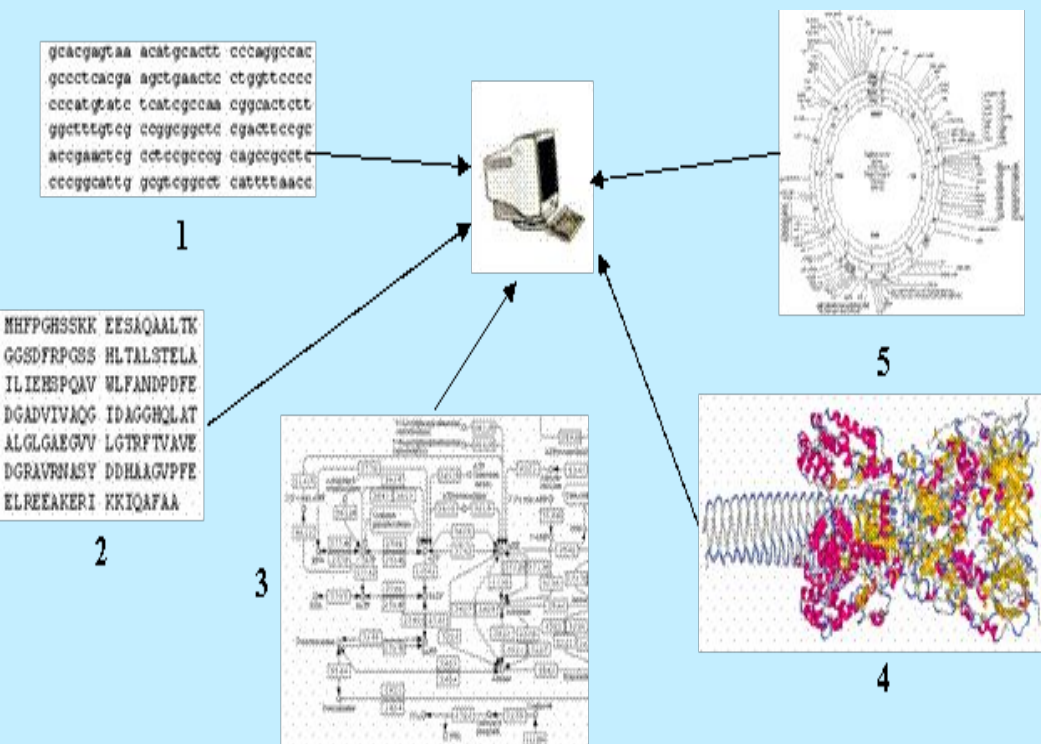
Существуют хранилища любой информации – **банки данных.**

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:

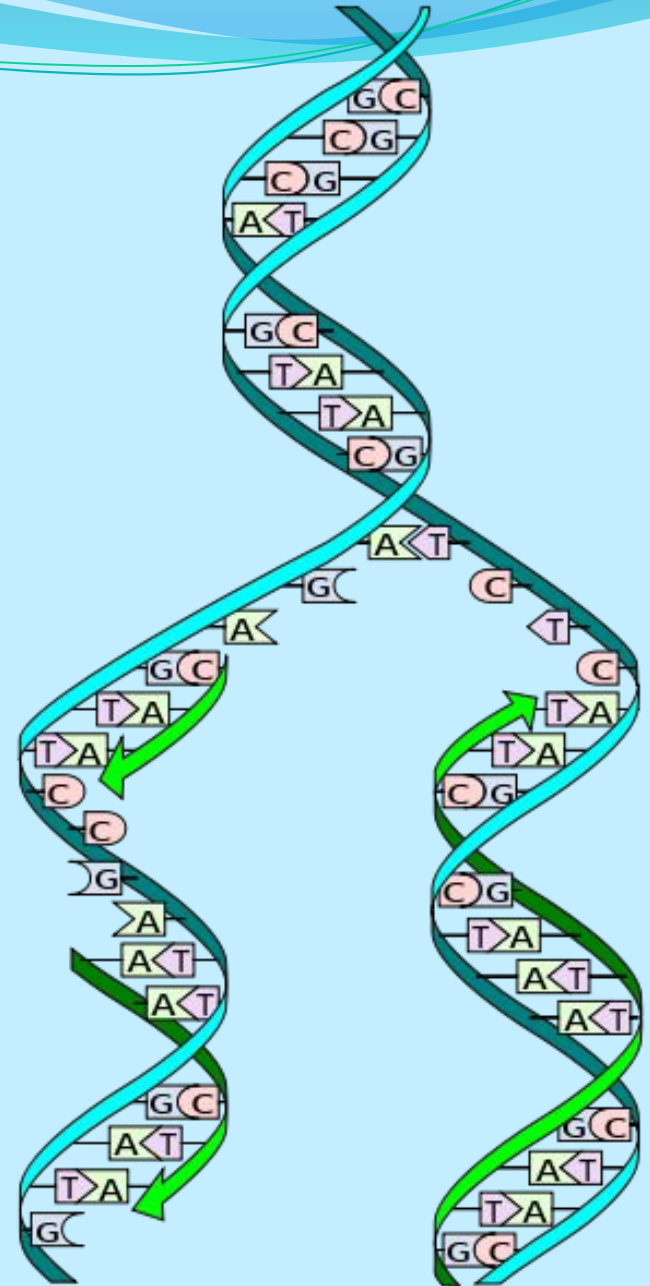
1. Анализ геномов, поиск в них генов.
2. Предсказание функции генов.
3. Оценка роли отдельных участков последовательности в функционировании белка.
4. Построение молекулярных моделей белков на основе их последовательностей.
5. Исследование механизма функционирования макромолекул, исходя из их моделей.

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 are represented by thick yellow ribbons, and the base pairs are shown as small spheres in red, blue, and white. The text "Спасибо за" is written in a large, bold, black font and is underlined with a thick black line. Below it, the word "внимание!!!" is also written in a large, bold, black font and underlined with a thick black line.

Спасибо за
внимание!!!