

Секвенирование ДНК. Принципы и использование биоинформационного анализа.



Что значит секвенирование ДНК?

Это этап молекулярного анализа какого-либо фрагмента ДНК.

Т.е секвенирование представляет собой определение нуклеотидной последовательности фрагмента ДНК путем получения серии комплементарных молекул ДНК



Два подхода к секвенированию ГЕНОМОВ

1. Классический подход («клон за клоном» или ВАС to ВАС)

- Конструирование геномных библиотек
- Отбор коллекции перекрывающихся клонов + физическое картирование
- Секвенирование отобранных клонов
- Аннотация генома

2. Шотган всего генома

метод определения последовательности длинных фрагментов ДНК, состоящий из расщепления их на короткие перекрывающиеся фрагменты, клонирования последних в секвенирующий вектор, определения последовательностей множества клонированных фрагментов и компьютерной сборки полученных последовательностей в единую структуру на основании нахождения перекрываний между НИМИ.



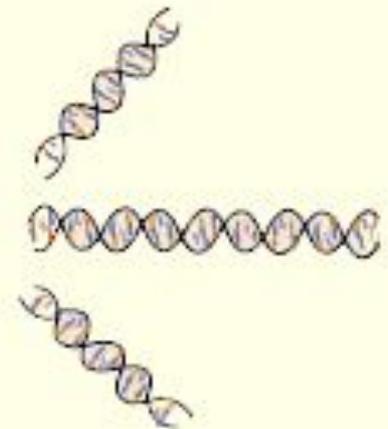
Шотган (метод дробовика)

основные стадии:

- Конструирование геномных библиотек
- Массовое секвенирование случайных клонов
- Компьютерная сборка перекрывающихся участков секвенированных фрагментов
- Финиширование : секвенирование оставшихся пробелов
- Аннотация генома



Shotgun Sequencing



Конструирование геномных библиотек

– это конструирование тех фрагментов ДНК, которые используются для секвенирования .

Существует 2 варианта конструирования этих библиотек :

- In Vivo – характерно для методик I поколения, ПРЕИМУЩЕСТВА: библиотеки созданные in vivo можно использовать и для других вещей, например в картировании геномов

Относят иерархический подход

- In vitro – характерно для методик II поколения, удобнее использовать

Относят шотган – подход

При конструировании геномных библиотек используют фаговые и плазмидные вектора.

Картирование генома

- **Генетическое картирование** - поиск места расположения в геноме гена или генетического маркера на основании его наследования в родословных по косегрегации с генами/маркерами известной локализации.

Непрямой метод, т.к. основывается на корреляции между признаком и участком хромосомы при передаче в ряду поколений или клеточных клонов.

- **Физическое картирование** - локализация гена или генетического маркера на основе анализа физического носителя генетической информации (хромосомы, молекулы ДНК)

Типы физических карт:

- Сегменты хромосомы при дифференциальном окрашивании
- Карта рестрикционных сайтов (рестрикционная карта)
- Упорядоченная библиотека клонов
- Последовательность оснований

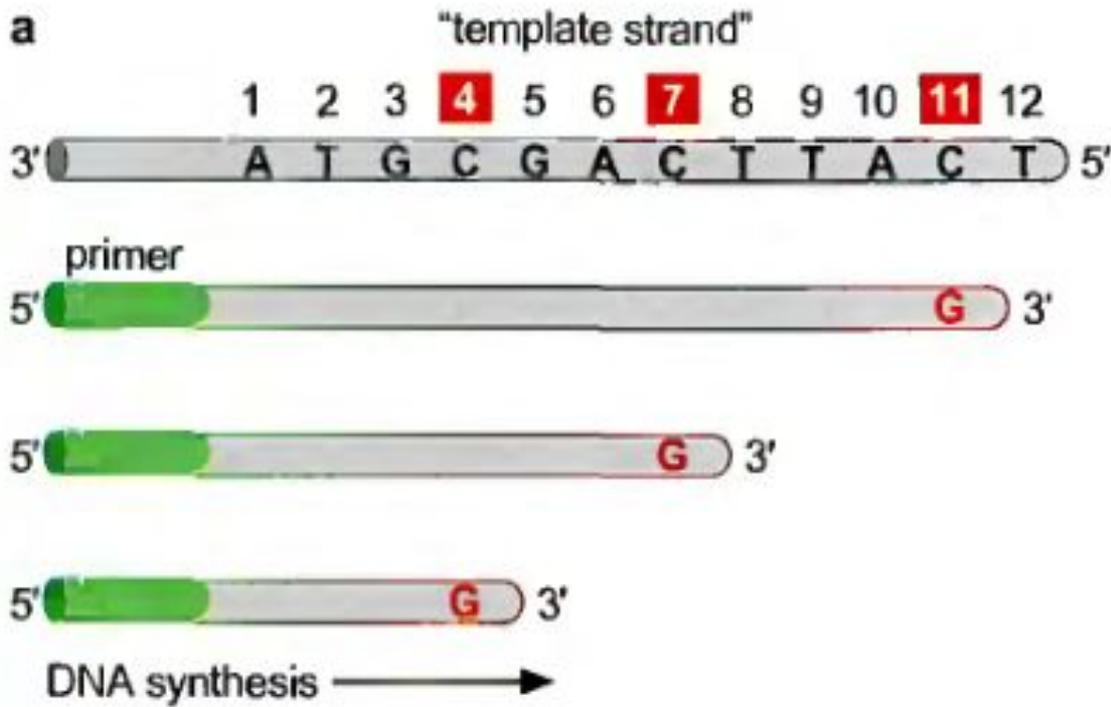
Аннотация генома

Аннотация генома (genome annotation): описание функциональных и структурных характеристик генома; местонахождение кодирующих участков генов в геноме, регуляторных элементов, регулирующих транскрипцию и другие функции генома, особенностей функционирования генома, в частности тканеспецифичности экспрессии генов и других функциональных свойств генома.

Технологии секвенирования

- Технологии секвенирования первого поколения
 - Sanger Sequencing
- Технологии секвенирования второго поколения
 - Roche - 454
 - Illumina – GA II
 - SOLiD
- Технологии секвенирования третьего поколения
 - Helicose
 - PacBio
 - Illumina = HiSeq, MiSeq
 - Ion Torrent
 - Oxford Nanopore

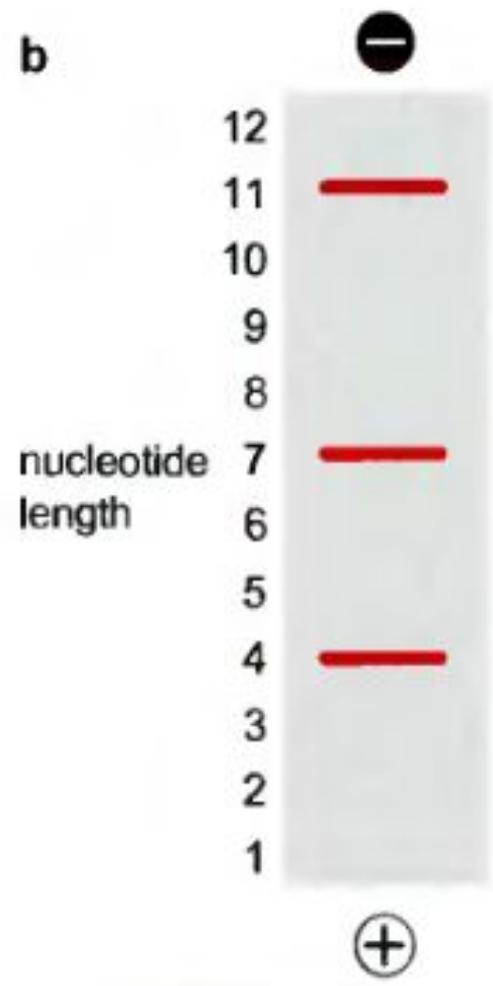
Секвенирование по Сэнгеру



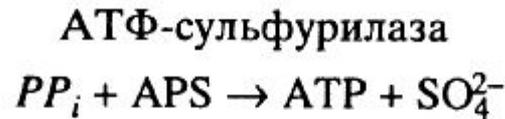
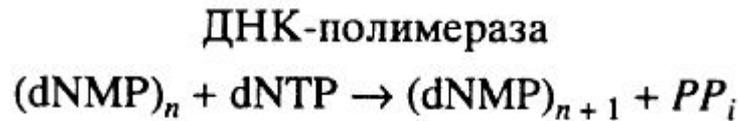
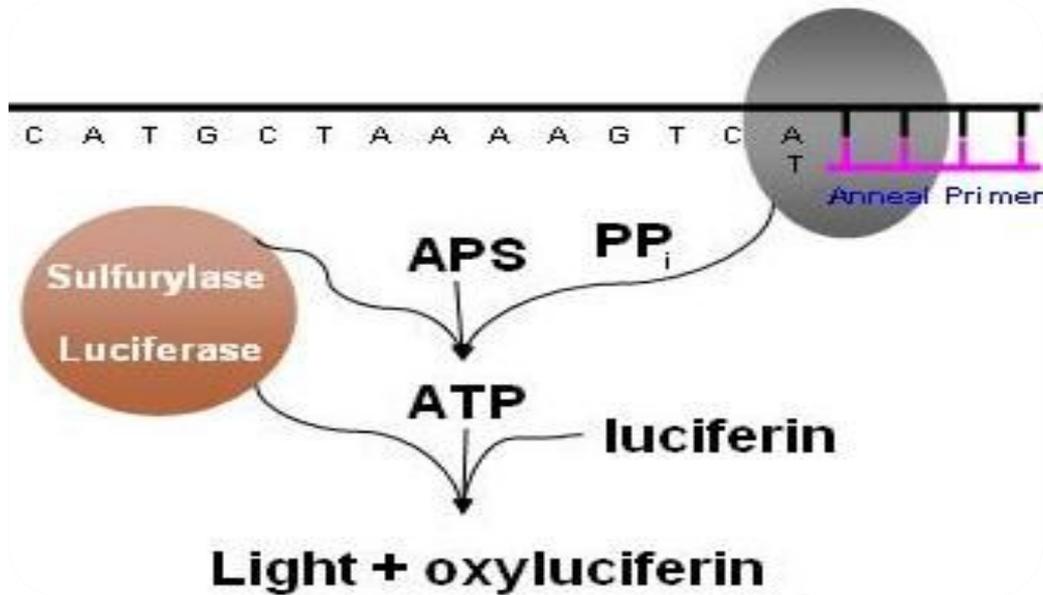
substrates:

dATP dGTP ddGTP

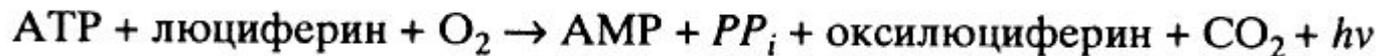
dCTP dTTP



Пиросеквенирование, принцип метода



Люцифераза

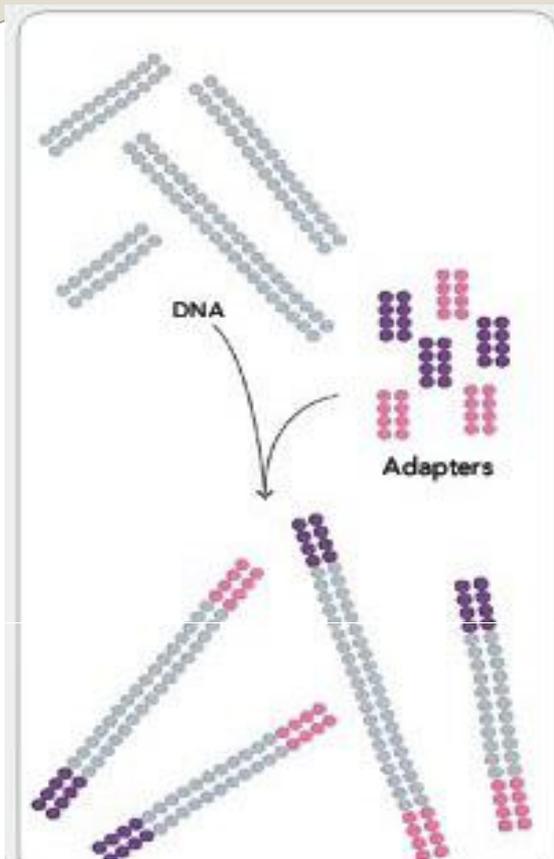


где, $(dNMP)_n$ – ДНК, а n – число нуклеотидных остатков, PP_i – неорганический пирофосфат, APS – аденозин 5'-фосфосульфат, $h\nu$ – квант света.

Illumina/Solexa

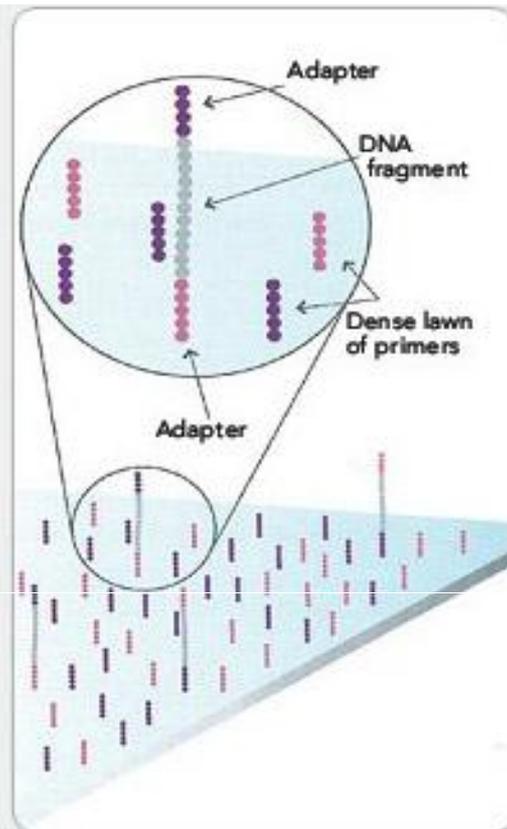
В методе Solexa используются

3'-модифицированные нуклеотиды с присоединенными флюоресцентными метками разных цветов. Модификация нуклеотидов не позволяет ДНК-полимеразе присоединить больше одного нуклеотида. Флюоресценция инициируется коротким импульсом лазера и тип присоединенного нуклеотида определяется по цвету флюоресцентной метки. Модификация нуклеотида блокируется (полимераза теперь может двигаться дальше) и цикл повторяется снова



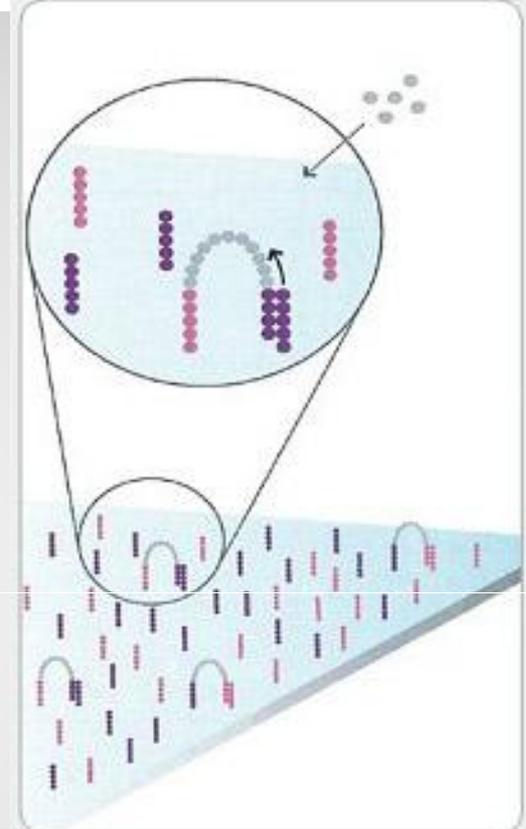
Шаг 1. Подготовка образца геномной ДНК.

Рандомное фрагментирование геномной ДНК и прикрепление адаптера к обоим концам фрагмента



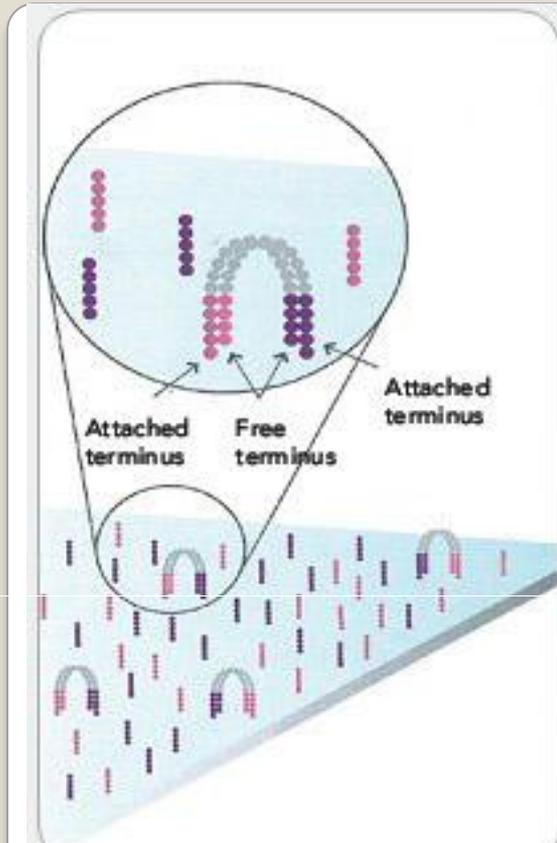
Шаг 2. Прикрепление ДНК к поверхности.

Рандомное связывание одноцепочечных фрагментов с внутренней поверхностью каналов кюветы.

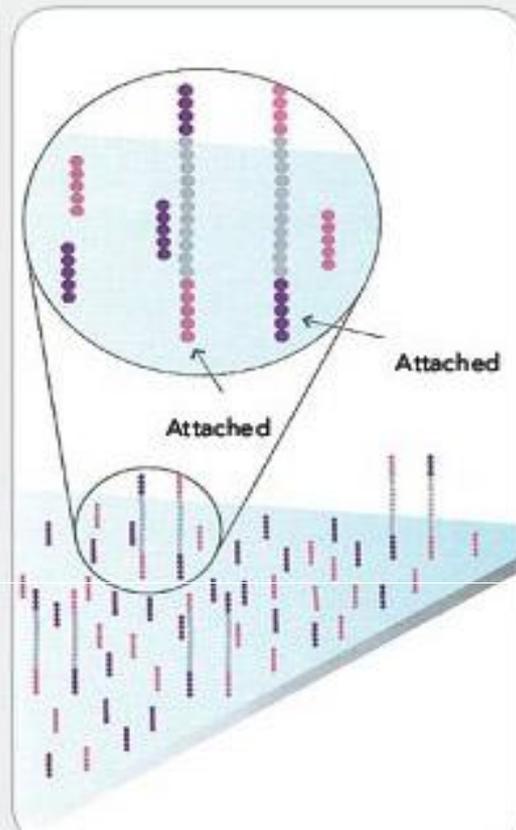


Шаг 3. Стыковочная амплификация.

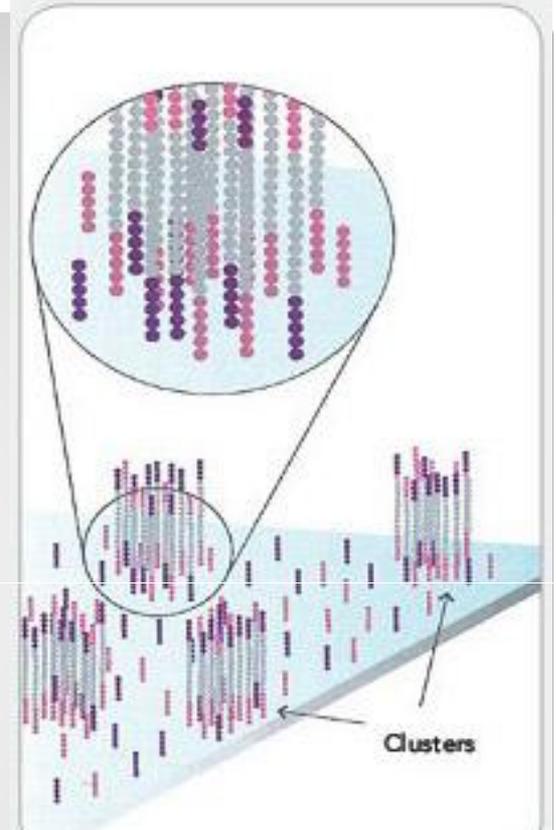
Добавление немеченных нуклеотидов и ферментов для инициации твердофазной стыковочной амплификации



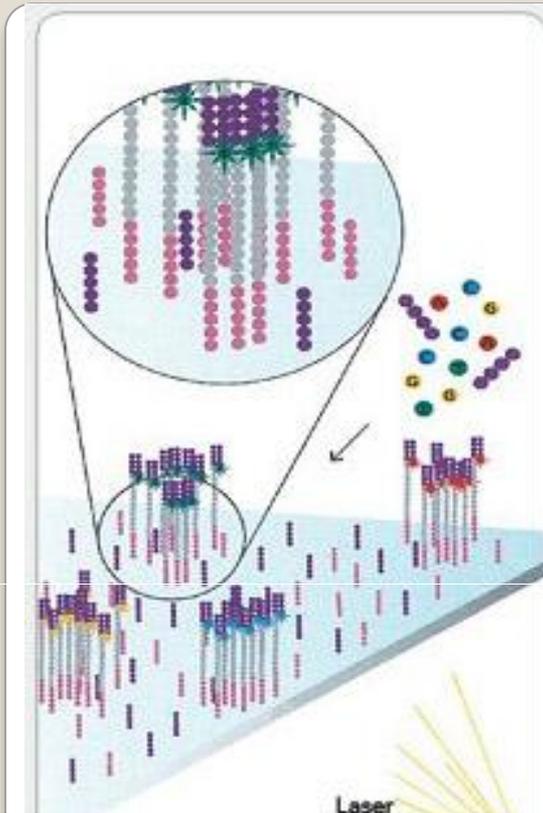
Шаг 4. Фрагменты становятся двухцепочечными. Фермент встраивает нуклеотиды в дополнительную комплиментарную цепь двухспиральных стыковочных участков на твердофазном субстрате



Шаг 5. Денатурация двухцепочечных молекул. Денатурация приводит к тому, что одноцепочечные шаблоны остаются прикрепленными (заякоренными) к субстрату



Шаг 6. Полная амплификация. Несколько миллионов плотных кластеров двухцепочечной ДНК генерируются на каждом канале кюветы



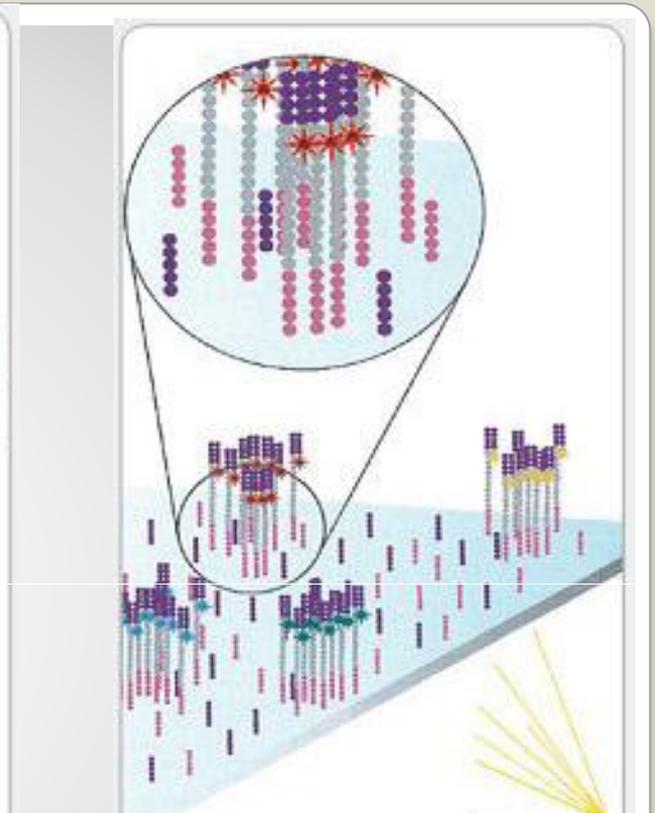
Шаг 7. Определение первого основания.

Добавляются все четыре обратимо меченных терминатора (обрывателя), праймеры и ДНК-полимераза.



Шаг 8. Фотографируется первое изображение.

После возбуждения лазером регистрируют картинку флуоресценции от каждого кластера на кювете. Записывают тип (А,С,G,Т) первого основания в каждом кластере



Шаг 9. Определение второго основания.

Добавляются все четыре обратимо меченных терминатора (обрывателя), праймеры и ДНК-полимераза

Ion Torrent Sequencing

Ионное полупроводниковое секвенирование (*Ion Semiconductor Sequencing*) является методом секвенирования ДНК основанным на обнаружении ионов водорода, которые выделяются во время полимеризации ДНК. Эта технология также называется рН-индуцированным секвенированием.

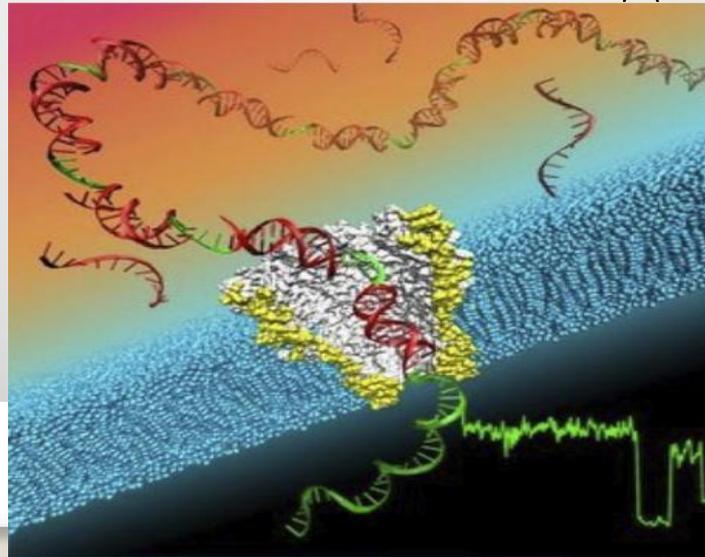


Applied Biosystems/SOLiD

SOLiD (*Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection*) — технология нового поколения секвенирования ДНК, развиваемая компанией Life Technologies (<http://www.solid.appliedbiosystems.com>), коммерчески доступна с 2006 года. SOLiD позволяет секвенировать разом сотни миллионов и даже миллиарды коротких последовательностей. По технологии SOLiD при секвенировании фрагменты ДНК лигируются на олигонуклеотидные адаптеры, прикрепленные к шарикам, далее они амплифицируются с помощью эмульсионной ПЦР.

Нанопоровое секвенирование Oxford Nanopore Technologies

Метод основан на измерении тока ионов через единичную нанопору в непроводящей мембране. При прохождении через эту пору нуклеотидов ток падает. Время, на которое изменяется ток ионов, и величина этого падения зависят от того, какой нуклеотид в данный момент находится внутри поры.



Oxford Nanopore Technology

- Latest sequencing technology announced last month
- Size of USB drive
- May drive the next revolution in genomics
- Whole genome sequencing in 15 minutes for less than \$1,000
- Commercially available by the end of this year

