

SEKVENOVÁNÍ DNA

- Jedna z metod studia genů
- Využití v aplikovaných oblastech molekulární biologie – např. medicíně při diagnostice genetických chorob

SEKVENOVÁNÍ DNA = stanovení pořadí nukleotidů

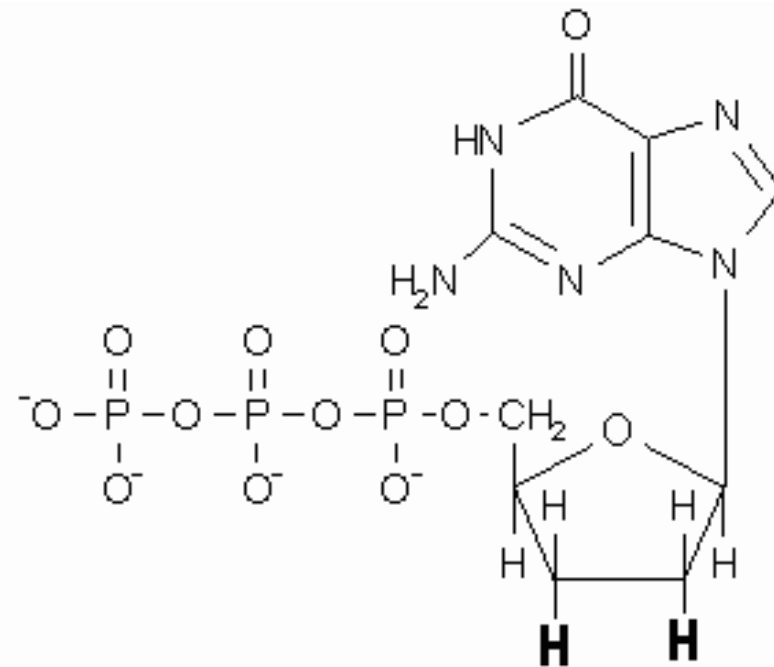
- Sekvenují se úseky délky několika set nukleotidů
- Delší úseky nutno rozdělit na kratší
- Překrývající se fragmenty a získané fragmenty se sekvenují odděleně.

Dvě metody sekvenování DNA

- Sekvenování DNA dle Sanger
(dideoxynukleotidová terminační metoda)
- Chemická metoda sekvenování DNA dle
Maxama a Gilberta

dideoxyribonukleotidy

- Na 2. a 3. Uhlíku pentosového zbytku nemají –OH skupinu
- Nemůže se k nim připojit žádný další nukleotid
- ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP



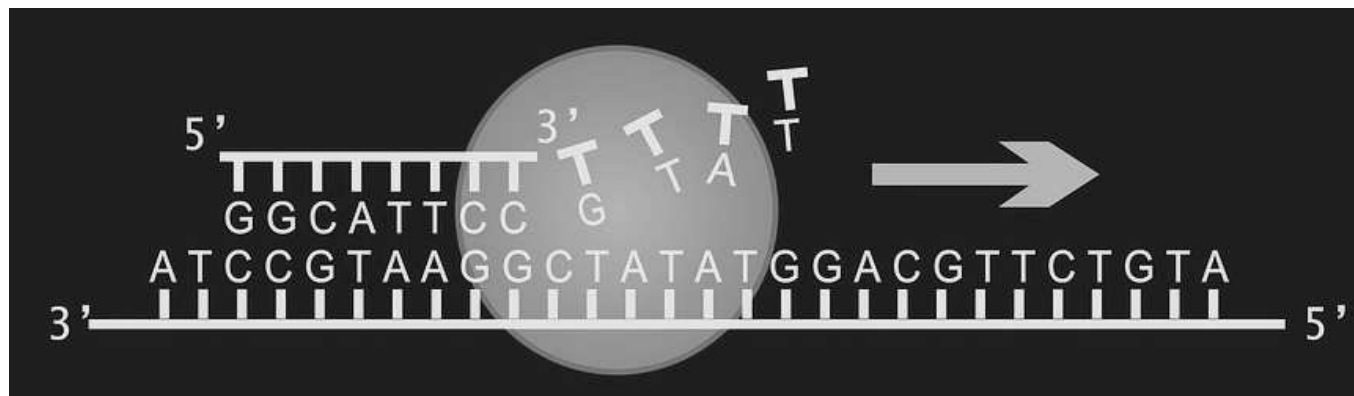
dideoxyguanosinetrifosfát, ddGTP

Sekvenování DNA dle Sanger

1.KROK

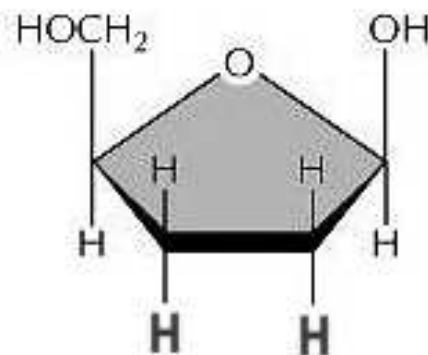
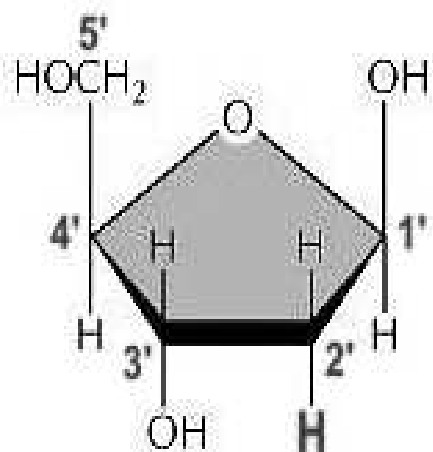
- „Přihybridizování“ sekvenčního primeru (počáteční krátká sekvence nukleotidů) k jednovláknové DNA, jejíž sekvence má být stanovena

- Sangerova metoda je založena na schopnosti DNA-polymerasy syntetizovat druhé vlákno DNA začínající od 3'-konce primeru



- Enzymy připojí nový nukleotid k –OH skupině na 3. uhlíku deoxyribosy

- Jestliže je pro syntézu použit abnormální 2,3-dideoxyribonukleotid (např. ddCTP) místo „normálního“ nukleotidu (2-deoxy), syntéza nemůže pokračovat



Z toho plyne:

- pokud jsou ve vlákně zabudované „normální“ deoxyribonukleotidy, syntéza probíhá
- Objeví-li se zabudovaná dideribonukleotid, syntéza je ukončena

TCAGACTAT TAG C ← chybí OH-skupina
AGTCTGATAATCGCTAACTGACCTGCACGTAAGCTGC

2. KROK

- Prodlužování primerů připojováním nukleotidů DNA polymerazou (dle komplementarity bází zkoumané DNA)
- Na místo deoxyribonukleotidu se do řetězce může včlenit jeho dideoxyribonukleotidový analog = polymerizace komplementárního vlákna je ukončena
- Vznikají různě dlouhé úseky sekvenovaných molekul DNA VŽDY končících příslušným dideoxyribonukleotidem

Vždy se provádějí 4 sekvenační reakce současně, do každého ze 4 vzorků je přidán jiný didenukleotid

TCAGACTATTGAC

AGTCTGATA ATCGCTAACTGACCTGCACGTAAGCTGC

TCAGACTATTAGCGATTGAC

AGTCTGATA ATCGCTAACTGACCTGCACGTAAGCTGC

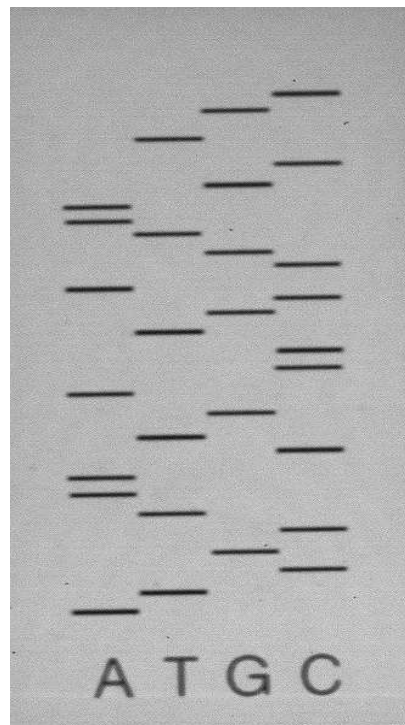
TCAGACTATTAGCGATTGACTGGAC

AGTCTGATA ATCGCTAACTGACCTGCACGTAAGCTGC

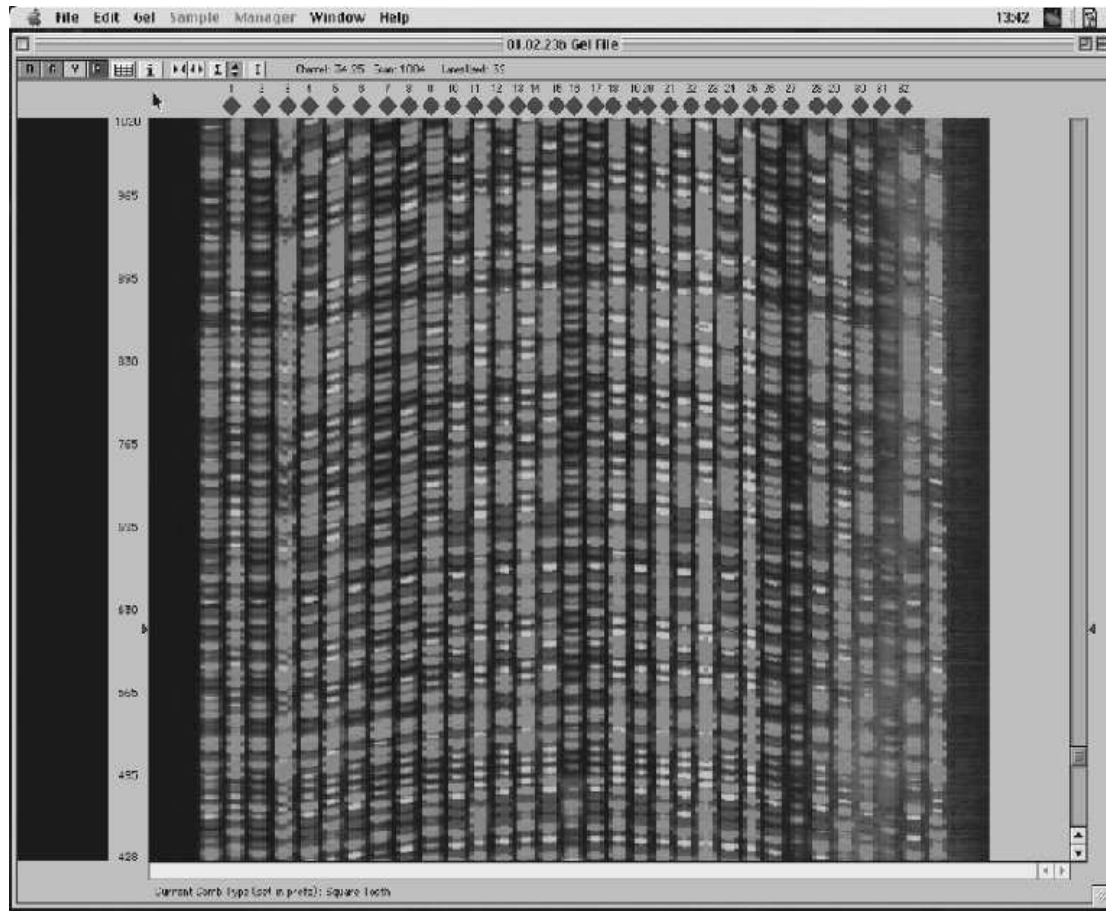
TCAGACTAT TAGCGATTGACTGGACGTCC

AGTCTGATA ATCGCTAACTGACCTGCACGTAAGCTGC

- Reakce probíhají v samostatných zkumavkách, výsledné směsy jsou nanášeny na gel a elektroforeticky rozděleny podle délky



Pro usnadnění detekce fragmentů se používají k syntéze DNA nukleotidy radioaktivně nebo fluorescenčně značené



Použití fluores-
cenčního značení

Chemická metoda sekvenování DNA dle Maxama a Gilberta

- DNA na jednom konci radioaktivně označena, chemicky štěpena činidly – specificky přeruší DNA řetězec v sousedství určitého nukleotidu
- Vzniká směs různě dlouhých štěpů
- 4 reakce probíhají souběžně
- Produkty se rozdělí elektroforeticky, radioaktivita proužků se detekuje pomocí autoradiografie