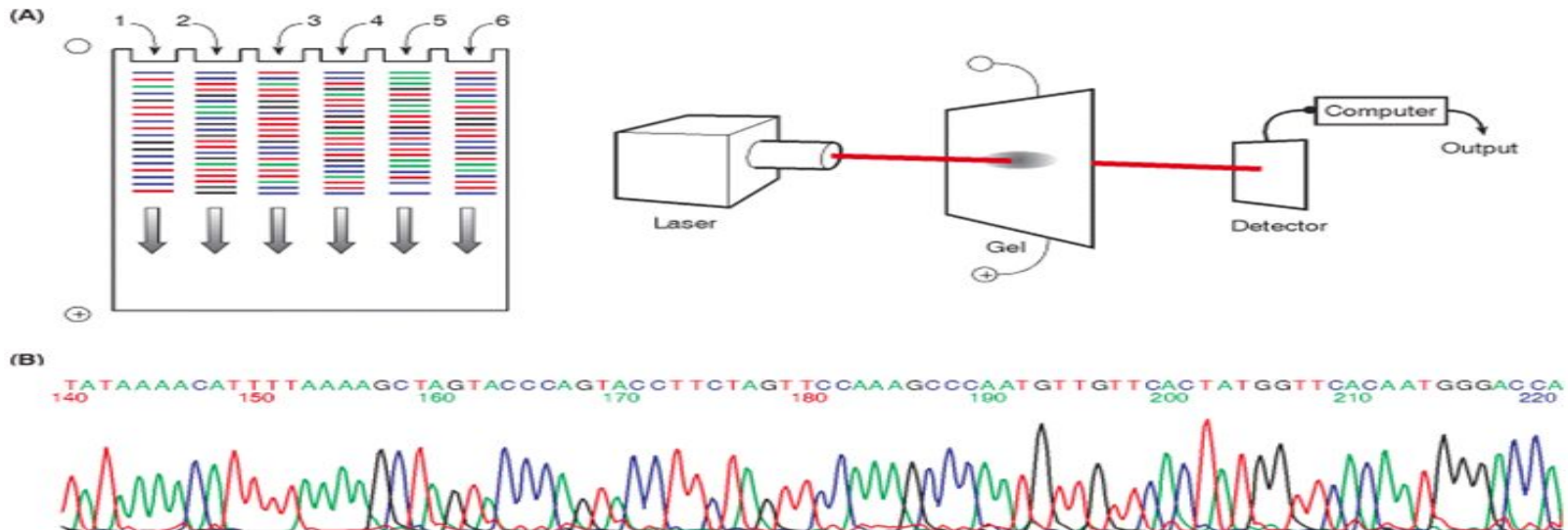


Медицинская биотехнология

5 курс

Секвенирование



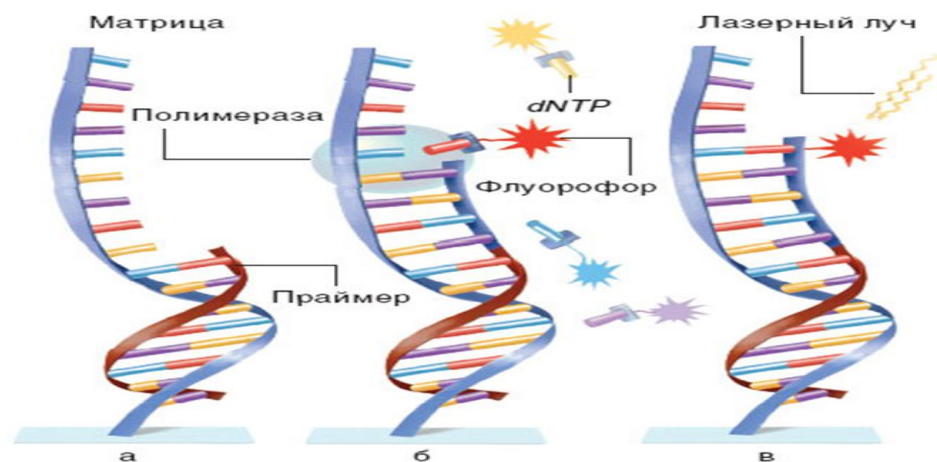
Под секвенированием ДНК понимают определение её нуклеотидной последовательности (от лат. sequentum — последовательность)

Расшифровка генома человека

- картирование генов
- выявление регуляторных элементов
- идентификация новых генетических маркеров
- эволюция человека и млекопитающих
- популяционные исследования
- дизайн праймеров для ДНК-диагностики

В повседневной практике научных и диагностических лабораторий

- идентификация патологических мутаций
- определение полиморфных вариантов
- построение карт метилирования генов-супрессоров
- проверка на различных этапах создания генно-инженерных конструкций, при разработке контролей для тест-систем



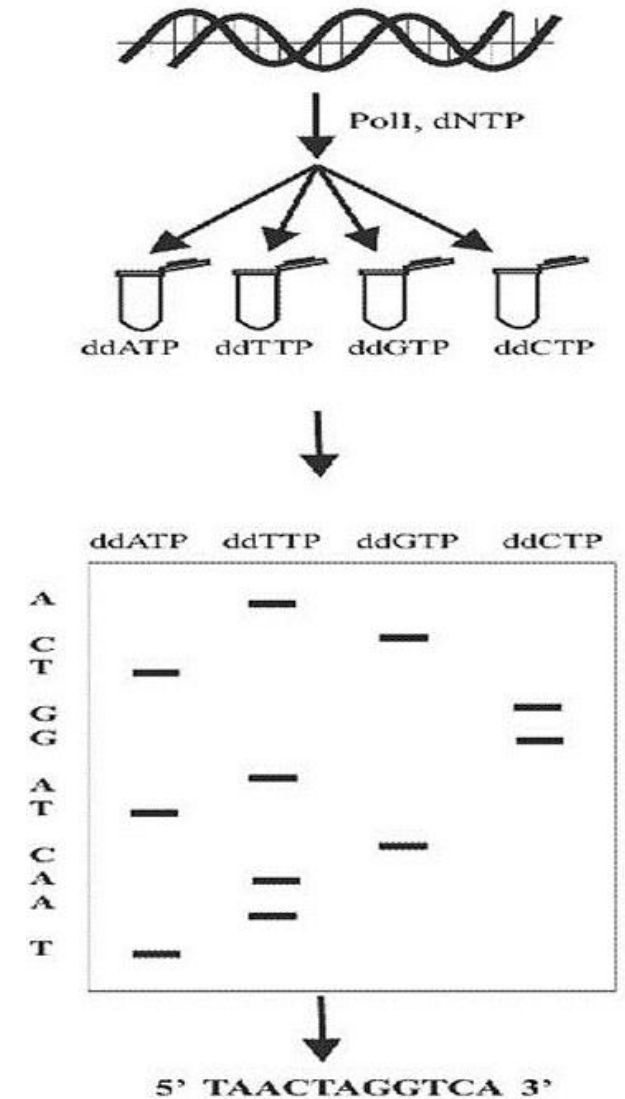
- 1. 1953 г. – двойная спираль ДНК Д. Уотсона и Ф. Крика (нобелевская премия в 1962 г.)**
- 2. 1959 г. – нобелевская премия А. Корнбергу и С. Очоа за открытие механизма биосинтеза нуклеиновых кислот**
- 3. 1977 г. – У. Гилберт и Ф. Сэнгер опубликовали разработанные ими методы секвенирования (нобелевская премия в 1980 г.)**
- 4. 1978 г. – нобелевская премия В. Арберу, Г. Смитсу и Д. Натансону за открытие эндонуклеаз рестрикции**
- 5. 1993 г. – нобелевская премия К. Мюллису за ПЦР и М. Смитсу за направленный мутагенез**

Первый метод прямого секвенирования ДНК – «плюс-минус метод»

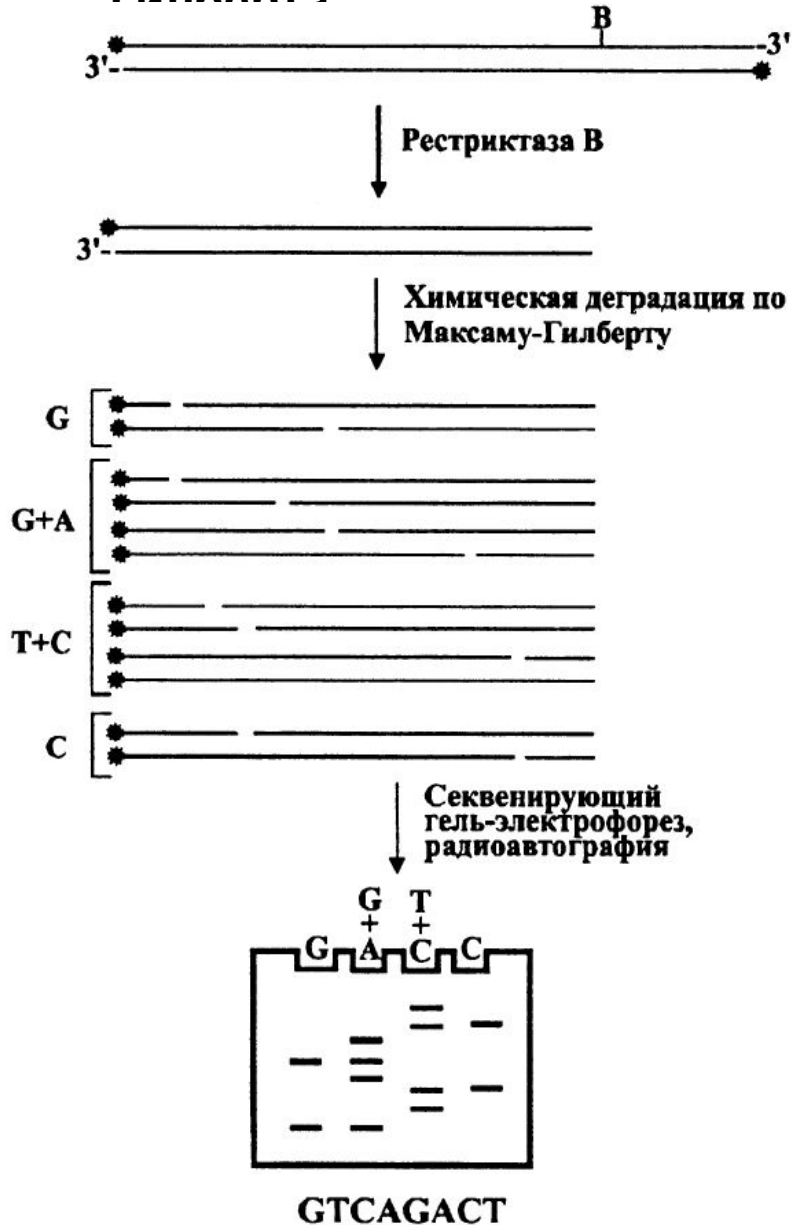
Разработан к 1975 г. Сэнгером и Коулсоном

В "плюс" системе проводили четыре реакции в присутствии каждого из четырех типов нуклеотидов, а в "минус" системе - в отсутствие каждого из них. В результате, в "минус" системе терминация происходила перед dNTP данного типа, а в "плюс" системе - после него.

Полученные таким образом восемь образцов разделяли с помощью электрофореза, "считывали" сигнал и определяли последовательность исходной ДНК.

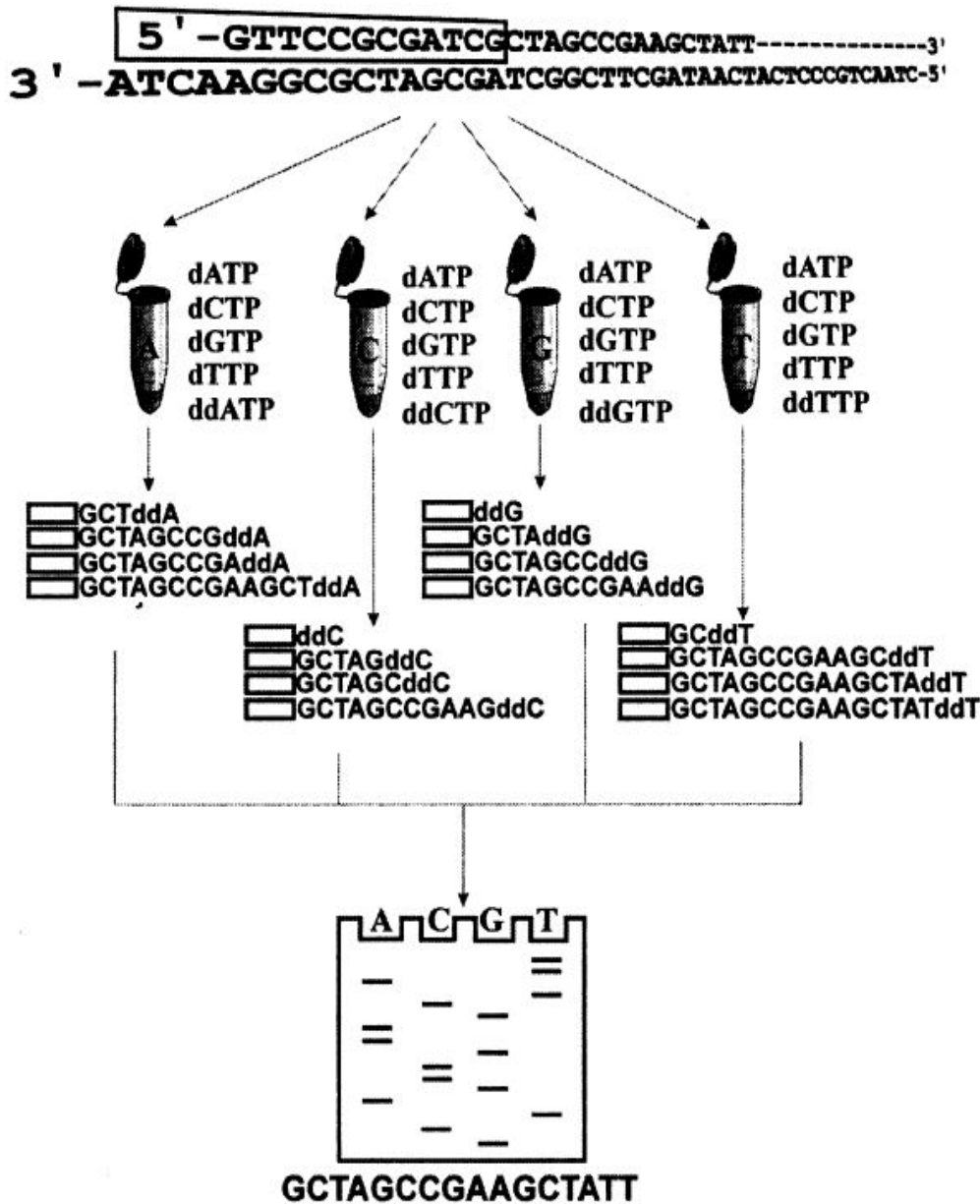


Метод Максама-Гилберта



Пуриновые основания обрабатывают 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. Если реакцию вести в бессолевой среде, то модифицируются как цитозин, так и тимидин; если обработку вести в присутствии 2M NaCl, то модифицируется лишь цитозин. Расщепление цепи ДНК на фрагменты и в этом случае осуществляется пиперидином. Условия реакций авторы подбирали таким образом, чтобы в итоге получить полный набор субфрагментов разной длины. Последующий электрофорез в полиакриламидном геле позволяет восстановить полную структуру исследуемого фрагмента.

СЕКВЕНИРОВАНИЕ ПО МЕТОДУ Сенгера



В основе метода лежало ферментативное копирование с помощью фрагмента Кленова ДНК полимеразы I из E.coli. В качестве праймеров использовали синтетические олигонуклеотиды. Специфическую терминацию синтеза обеспечивали добавлением в реакционную смесь помимо четырех типов dNTP (один из которых был радиоактивно мечен по альфа положению фосфата) еще и одного 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 авторы подбирали экспериментально, так, чтобы в итоге получить набор копий ДНК различной длины. Таким образом, для определения первичной структуры исследуемого фрагмента ДНК требовалось провести четыре реакции копирования: по одному типу терминаторов в каждой из реакций. После этого полученные продукты разгонялись в полиакриламидном геле на соседних дорожках и по расположению полос определялась последовательность нуклеотидов.

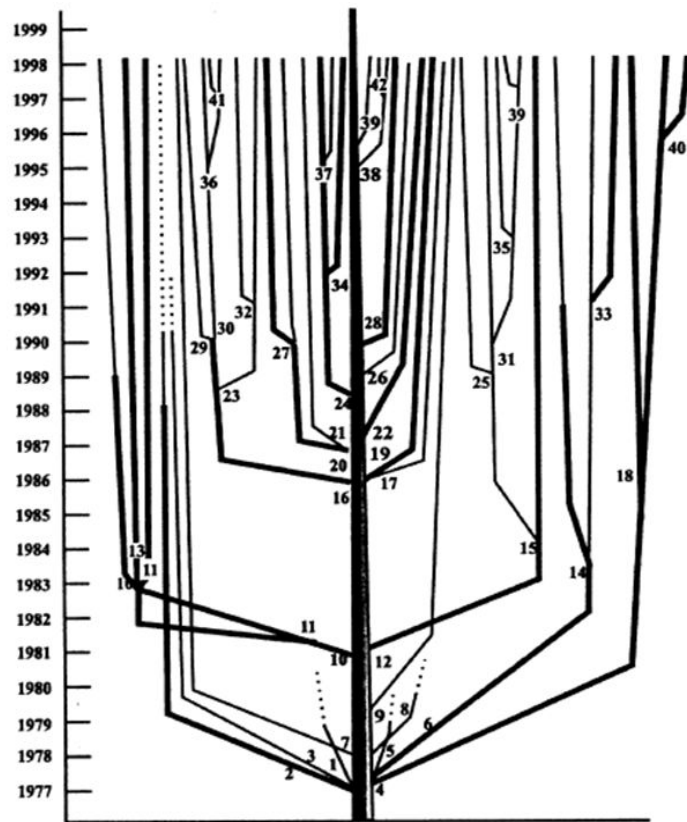
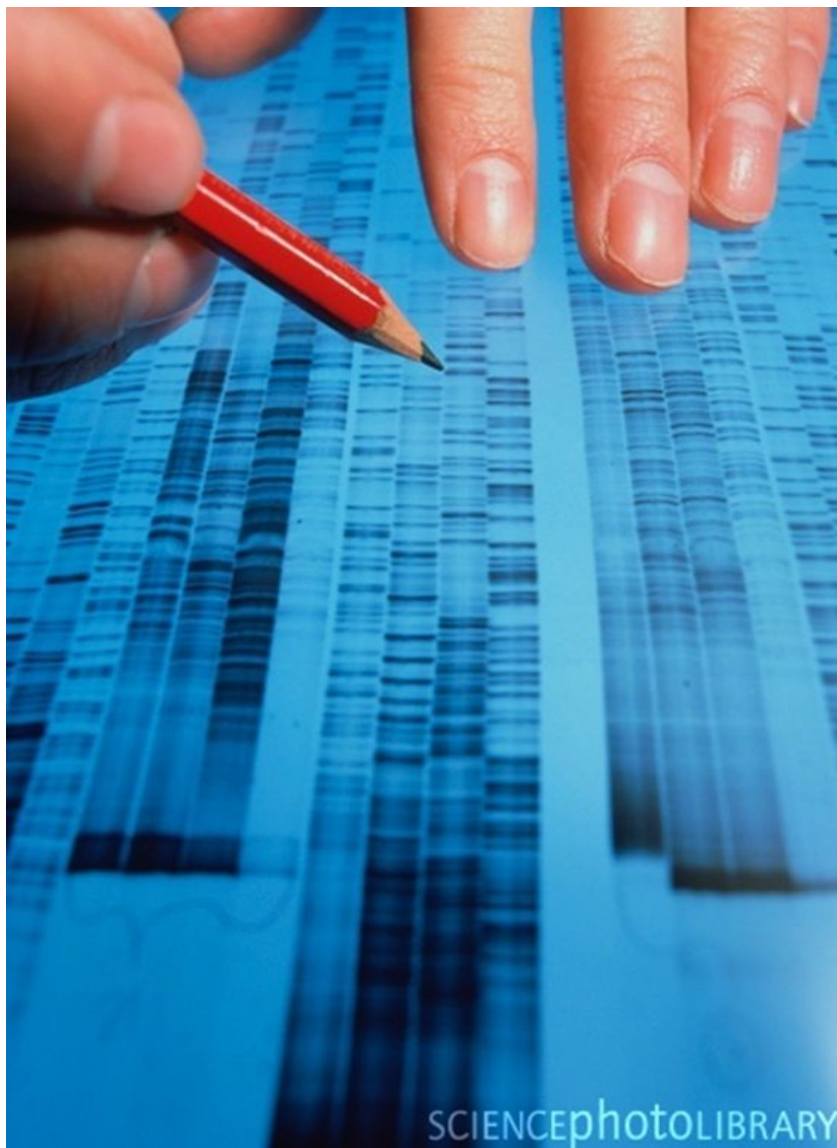


Рис. 14.2. Эволюционное "дерево" развития метода секвенирования ДНК ферментативным построением комплементарной цепи в условиях специфической терминации

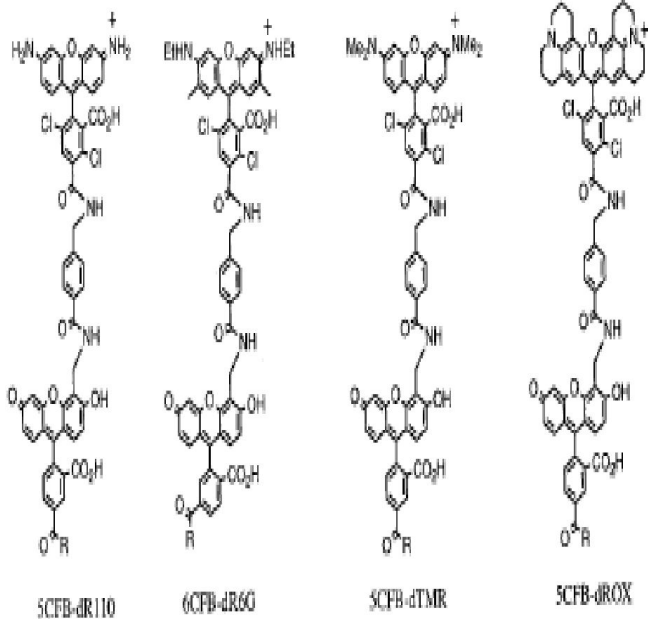
1 – природные одноцепочечные ДНК фагов; 2 – Кленовский фрагмент ДНК-полимеразы I; 3 – различные способы удаления одной из цепей ДНК; 4 – внутреннее мечение; 5 – короткие олигонуклеотиды; 6 – радионуклид ^{32}P ; 7 – ревертаза; 8 – биологические праймеры; 9 – дИТФ; 10 – плазмидные вектора; 11 – фаж M13; 12 – универсальный праймер; 13 – фагидные вектора; 14 – радионуклид ^{35}S ; 15 – 5'-концевое мечение праймера; 16 – наработка матриц с помощью ПЦР; 17 – 7-деаза-дГТФ; 18 – квазиконцевое мечение; 19 – флуоресцентное мечение праймера; 20 – секвенсаза, версия 1.0; 21 – Bst ДНК-полимераза; 22 – флуоресцентно меченные ддНТФ; 23 – преимущественная наработка одной цепи ДНК с помощью асимметричной ПЦР; 24 – Taq ДНК-полимераза; 25 – библиотека коротких олигонуклеотидов; 26 – флуоресцентно меченные дНТФ; 27 – секвенсаза, версия 2.0; 28 – хемилюминесцентное мечение; 29 – твердофазная ПЦР; 30 – циклическое секвенирование; 31 – модульные праймеры; 32 – температурная асимметричная ПЦР; 33 – радионуклид ^{33}P ; 34 – ΔTaq ДНК-полимераза; 35 – модифицированные модульные праймеры; 36 – полуж экспоненциальное секвенирование; 37 – термосеквенсаза; 38 – окрашивающие серебром; 39 – ддНТФ, меченные радионуклидом ^{33}P ; 40 – одновременная амплификация и секвенирование двумя разными ДНК-полимеразами; 41 – дифференциальное удлинение праймера

Флуоресцентные красители

Флуоресценция – излучение, возникающее при переходе электрона из возбужденного состояния в основное.

- спектр эмиссии не зависит от длины волны возбуждения (он зависит от строения молекулы флуорофора и условий, в которых он находится – pH и т.п.)
- длина волны испускаемого света больше длины волны возбуждения из-за энергетических потерь (в секвенаторах Applied Biosystems возбуждающий и испускаемый свет находится в видимой части спектра 450-650 нм)
- квантовый выход флуоресценции – важен для секвенирования (отношение числа испускаемых фотонов к числу поглощенных)

Первыми флуорофорами, адаптированными к нуждам секвенирования, стали соединения из семейства флуоресцеиновых (FAM, JOE) и родаминовых (TAMRA, ROX, R110, R6G) красителей. Следующее поколение флуорофоров этого семейства - dTAMRA, dROX, dR110, dR6G - получило довесок из двух остатков хлора. Это позволило несколько снизить перекрывание спектров испускаемого света и значительно повысить интенсивность флуоресценции, а значит и чувствительность. Еще более высоким выходом флуоресценции характеризуются "трехкомпонентные" красители класса BigDye™ (Applied Biosystems), при конструировании которых был использован принцип переноса энергии. Под переносом энергии понимают явление безизлучательного переноса энергии возбужденного состояния от донора к акцептору. Донором в BigDye™ является 4'-аминометил-5(или 6)-карбоксифлуоресцеин, который связан с акцептором (представителем семейства d-родаминов) через остаток 4-аминометилбензойной кислоты.



Полимеразы для автоматического секвенирования ДНК

В оригинальной работе Ф. Сэнгера для проведения сиквенсовых реакций был использован Кленовский фрагмент ДНК-полимеразы I из E.Coli.

В настоящее время для секвенирования используют рекомбинантные ДНК-полимеразы, отвечающие следующим требованиям:

- отсутствие 3'- и 5'-экзонуклеазной активности,
- отсутствие дискриминации по включению в растущую цепь как обычных, так и модифицированных (меченных) ddNTP.

Всего существует два разных подхода. В первом случае (сейчас практически не используется) копирование осуществляется при 37°C высокопроцессивными термолабильными полимеразми (например, T7 DNA polymerase). Однако наиболее распространен второй способ - циклический процесс, который включает денатурацию, Biosystems.

Полученные в реакции секвенирования флуоресцентно меченные одноцепочные фрагменты ДНК разделяют с помощью электрофореза в полиакриламидном геле. Гели, используемые в секвенировании должны позволять разделять фрагменты, отличающиеся друг от друга на один нуклеотид в широком диапазоне длин. 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. В автоматическом секвенировании используют капиллярный электрофорез в линейном полиакриламиде. Капилляры представляют собой стеклянную трубку длиной 30-100 см, закатанную в полимерный пластификатор. Небольшой диаметр капилляра (50-100 мкм) позволяет проводить разделение значительно быстрее, чем в обычных гелях. Кроме того, капиллярные секвенаторы позволяют обеспечивать гораздо более высокую чувствительность за счет отсутствия горизонтальной диффузии.

Последовательность действий при секвенировании ДНК

1. Получение матрицы для секвенирования (ПЦР-продукт, плаزمид)
2. Очистка матрицы от невключившихся праймеров, dNTPs и других примесей.
3. Проведение реакции секвенирования (наработка пула фрагментов различной длины, комплементарных матричной молекуле и заканчивающихся меченым ddNTP.)
4. Очистка продуктов реакции от невключившихся меченых ddNTPs и других примесей, которые могут влиять на подвижность и/или флуоресценцию полученных продуктов.
5. Электрофорез меченых фрагментов в денатурирующих условиях при высоком разрешении в капиллярных генетических анализаторах и автоматическая детекция флуоресцентных сигналов.
6. Анализ первичных данных и построение хроматограммы , идентификация мутаций или полиморфизмов.

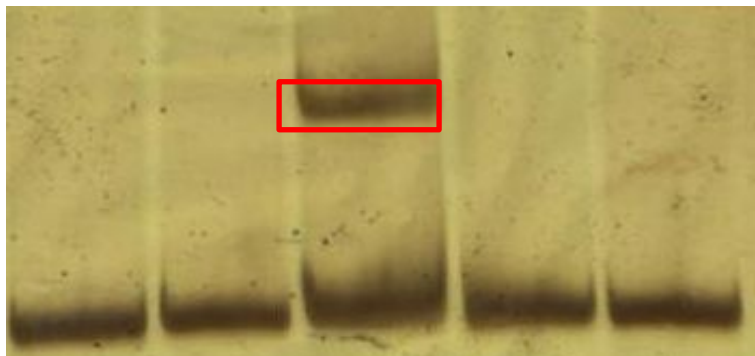
Очистка ПЦР-продукта перед секвенированием



Очистка целевого ПЦР-продукта от неспецифических фрагментов с помощью электрофореза

Агарозный гель-электрофорез

1,5% агарозы, 0,5x-буфер TBE, 150-200 В)



1. После электрофореза вырезать в проходящем УФ полосу геля с целевым ПЦР-продуктом, затем добавить связывающий буфер в соотношении 1 мкл буфера на 1 мг геля.
2. Инкубировать пробирку при 55°C в течение, примерно, 10 мин до полного растворения геля. Если длина фрагмента < 500 п.н., то добавить изопропанол в соотношении 1/3 от исходной массы полосы геля и перемешать.
3. Нанести полученную смесь (до 800 мкл) на колонку для сорбции и центрифугировать 1 мин при 12 тыс. об./мин. Еще раз нанести 100 мкл буфера и центрифугировать. Поместить колонку в новую пробирку.
4. Добавить 700 мкл отмывочного буфера и центрифугировать 1 мин при 12 тыс. об./мин.
5. Нанести в центр колонки 50 мкл отмывочного буфера, подождать 1-2 мин и центрифугировать 1 мин при 12 тыс. об./мин. Отфильтрованный раствор ДНК можно использовать для секвенирования.

ПААГ-электрофорез

(8% ПААГ – АА:бис-АА как 19:1, 1x-буфер TBE, 300-400 В)



1. После завершения электрофореза и окраски геля вырезать скальпелем или иглой от шприца полосу с целевым ПЦР-продуктом.
2. Измельчить вырезанную полосу геля на дне пробирки 1,5 мл, затем добавить 0,5 мл буфера TE (10 mM Трис-НСl, 10 mM ЭДТА, рН 8,0), перемешать на вортексе.
3. Инкубировать при 37°C в течение ночи (overnight), затем центрифугировать 5 мин при 12 тыс. об./мин. Перенести супернатант в новую пробирку, добавить 1/10 объема 3М ацетата натрия и 2 объема 96%-го этанола или 1,5 объема изопропанола, перемешать на вортексе и инкубировать 20 мин при -20°C.
4. Центрифугировать полученную смесь 15 мин при 12 тыс. об./мин. Удалить супернатант, не задевая осадка.
4. Высушить осадок, затем растворить его в 20-25 мкл деионизованной воды или TE.

Методы элюции и очистки ПЦР-продукта (продолжение)

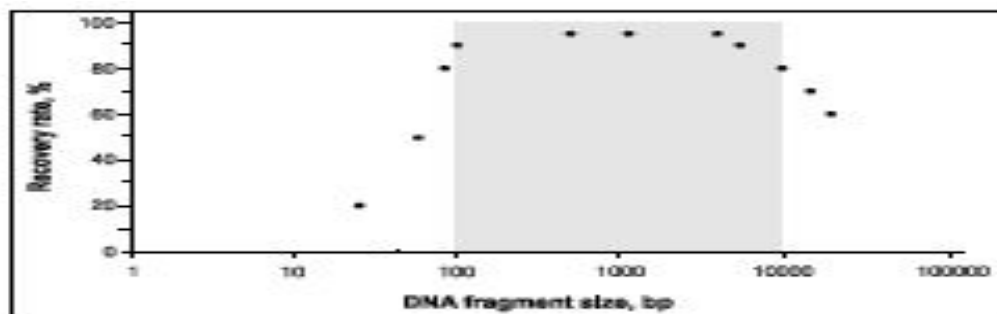


График эффективности очистки на silica spin-колонках

Fig. 1. Recovery dependence on DNA fragment size

1. Растворение LMP-агарозы

1. Вырезать полосу геля, содержащую анализируемый ПЦР-продукт, взвесить. Затем добавить буфер TE, чтобы итоговая концентрация агарозы стала $< 0,5\%$.
2. Довести полученную смесь сухим NaCl до концентрации соли $0,1\text{M}$. Далее инкубировать при 65°C в течение 10 мин, несколько раз перемешивая (пока гель полностью растворится).
3. Охладить до комнатной температуры и экстрагировать фенол-хлороформным методом.
4. Добавить 10M ацетат аммония в количестве $\frac{1}{4}$ объема исходной смеси и 2-кратный объем 96% -ого этанола или 1,5-кратный объем изопропанола. Перемешать на вортексе, затем инкубировать 20 мин при -20°C .
5. Центрифугировать полученную смесь 15 мин при 12 тыс. об./мин. Удалить супернатант, не задевая осадка. Осадок сполоснуть 70% -ым этанолом, высушить.
6. Растворить осадок в деионизованной воде или буфере TE.

2. Выделение ПЦР-продукта из лунки с помощью полиэтиленгликоля.

3. Элюция ПЦР-продукта из полосы геля с помощью диализного мешка.

Проведение реакции секвенирования

Требования некоторых лабораторий к образцам для секвенирования

- 1.«Синтол»: не менее 10 нг матрицы (очищенный ПЦР-продукт до 500 п.н.), 10 мкл праймера в концентрации 3,2 пмоль/мкл, один анализ – 350 руб.
- 2.Центр коллективного пользования в ИМБ: очищенный ПЦР-продукт, праймер в количестве 3,2 пмоль на реакцию, цена одного образца – 260 руб.
- 3.«СибЭнзим»: не менее 2 мкг очищенного ПЦР-продукта, 20 пмоль праймера (для растворов определены минимальные концентрации), один анализ – 900 руб.

Постановка реакции:

- 1.К 3 мкл очищенного ПЦР-продукта добавить 3 мкл деионизованной воды, 2 мкл праймера для секвенирования (концентрация 5 пмоль/мкл) и 3 мкл BigDye™ Terminator v. 3.1 Kit.
- 2.Поместить образцы в термоциклер и запустить программу:

96°C – 1 мин

96°C – 10 с

55°C – 5 с

60°C – 4 мин

} 25 циклов

Охлаждение до 4°

С

Template	Quantity
PCR product: 100–200 bp 200–500 bp 500–1000 bp 1000–2000 bp >2000 bp	1–3 ng 3–10 ng 5–20 ng 10–40 ng 20–50 ng
Single-stranded	25–50 ng
Double-stranded	150–300 ng
Cosmid, BAC	0.5–1.0 µg
Bacterial genomic DNA	2–3 µg

Праймера – 3,2 пмоль на реакцию,
матрицы – в соответствии с таблицей

Очистка образцов после реакции секвенирования

Необходимо избавиться от:

- невключившихся меченых ddNTPs
- ионов, которые могут влиять на подвижность меченных фрагментов в капилляре

1. BigDye Xterminator® Purification Kit

- 1) Добавить к 10 мкл реакционной смеси 45 мкл реактива SAM, а затем 10 мкл реактива BigDye, перемешивать 30 мин при комнатной температуре.
- 2) Центрифугировать плашку 1 мин при 3 тыс. об. мин. Образцы готовы для постановки в генетический анализатор.

2. Centri-Sep™ Columns

- 1) *Добавить в колонку 800 мкл деионизованной воды и оставить при комнатной температуре на 30 мин.*
- 2) *Центрифугировать колонку 2 мин со скоростью 3 тыс. об. мин., затем поместить колонку в новую пробирку на 1,5 мл.*
- 3) *Нанести на сефадекс сверху 10 мкл реакционной смеси, центрифугировать 2 мин со скоростью 3 тыс. об. мин. Отфильтрованный раствор ДНК смешать с 20 мкл HiDi-формамида (деионизованного).*

3. Осаждение со спиртом

- 1) Добавить по 2 мкл 125мМ раствора ЭДТА в лунки с реакционной смесью, после того, как раствор ЭДТА достигнет дна лунок, добавить по 2 мкл 3М раствора ацетата натрия, который тоже должен достигнуть дна лунок.
- 2) Нанести в лунки по 50 мкл 100%-го этанола, перемешать, затем инкубировать при комнатной температуре 15 мин.
- 3) Центрифугировать при 4°C со скоростью 13 тыс. об. мин. в течение 30 мин.
- 4) Промыть осадок 70%-ым спиртом, подсушить.
- 5) Растворить осадок в 10 мкл деионизованной воды.

Автоматические секвенаторы

Applied Biosystems

- 310 Genetic Analyzer – 1 капилляр
- 3100 Avant Genetic Analyzer и 3130 Genetic analyzer – 4 капилляра
- 3500 и 3500 Dx Genetic Analyzers – 8 капилляров
- 3100** и 3130xl **Genetic Analyzers – 16 капилляров**
- 3500xl и 3500xl Dx Genetic Analyzers – 24 капилляра
- 3730 Genetic Analyzer – 48 капилляров
- 3730xl Genetic Analyzer – 96 капилляров



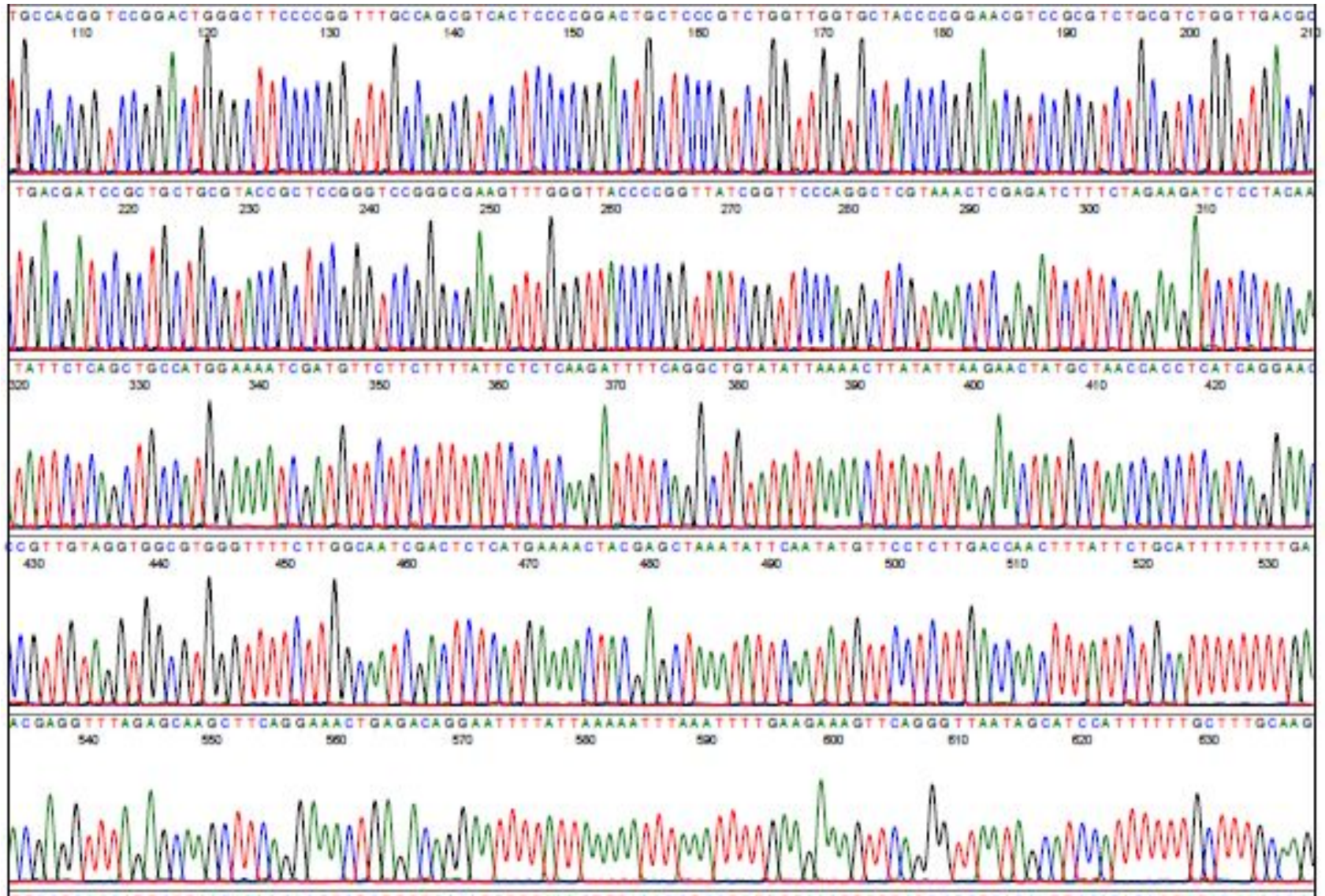
Beckman Coulter

- Seq8000 Genetic Analysis System

-Amersham

Какие бывают результаты?

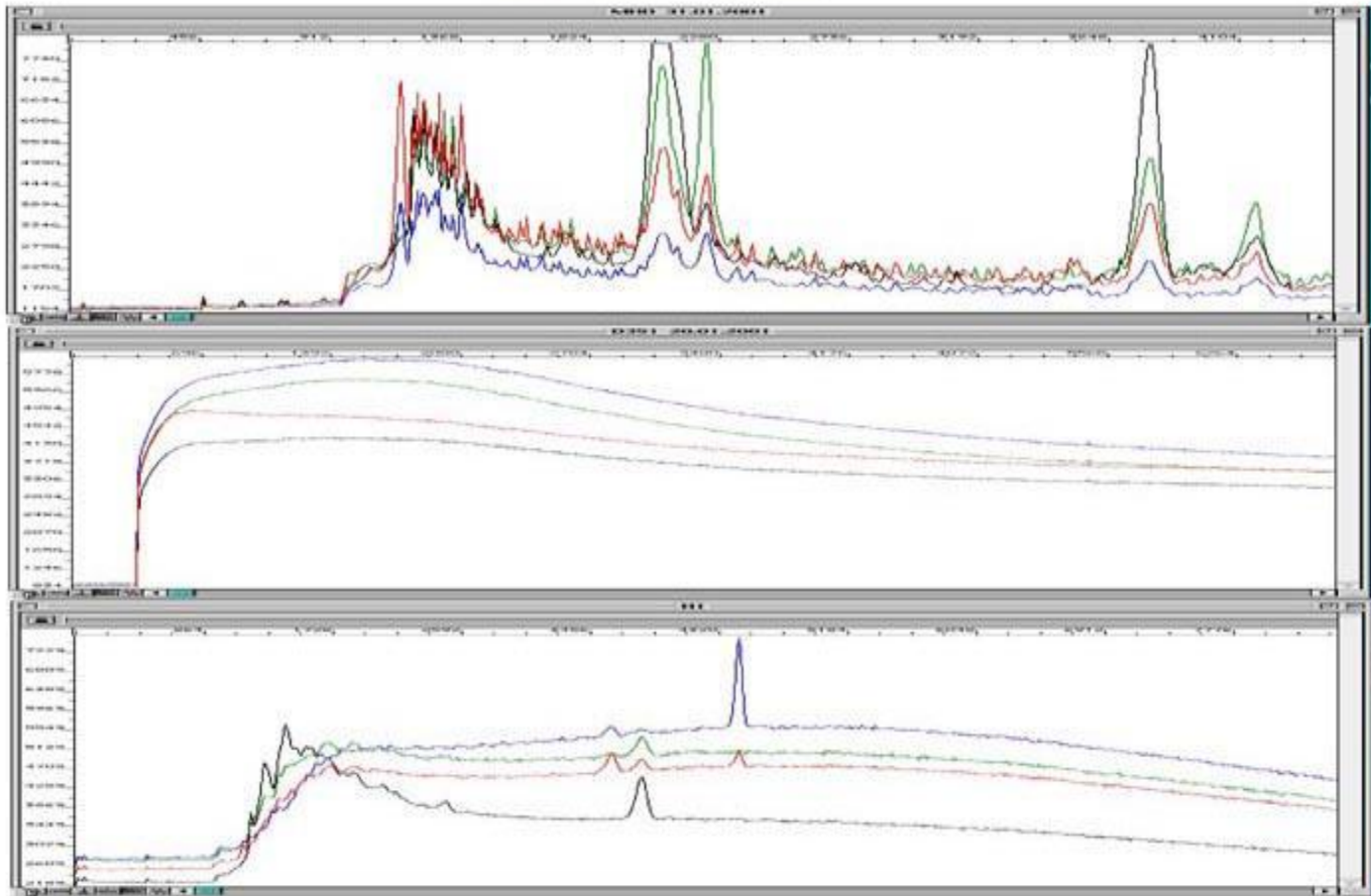
Сиквенс высокого качества (плазмидная ДНК)



Какие бывают результаты? (продолжение)

Не прошла (или прошла с очень низкой эффективностью) реакция селективизации

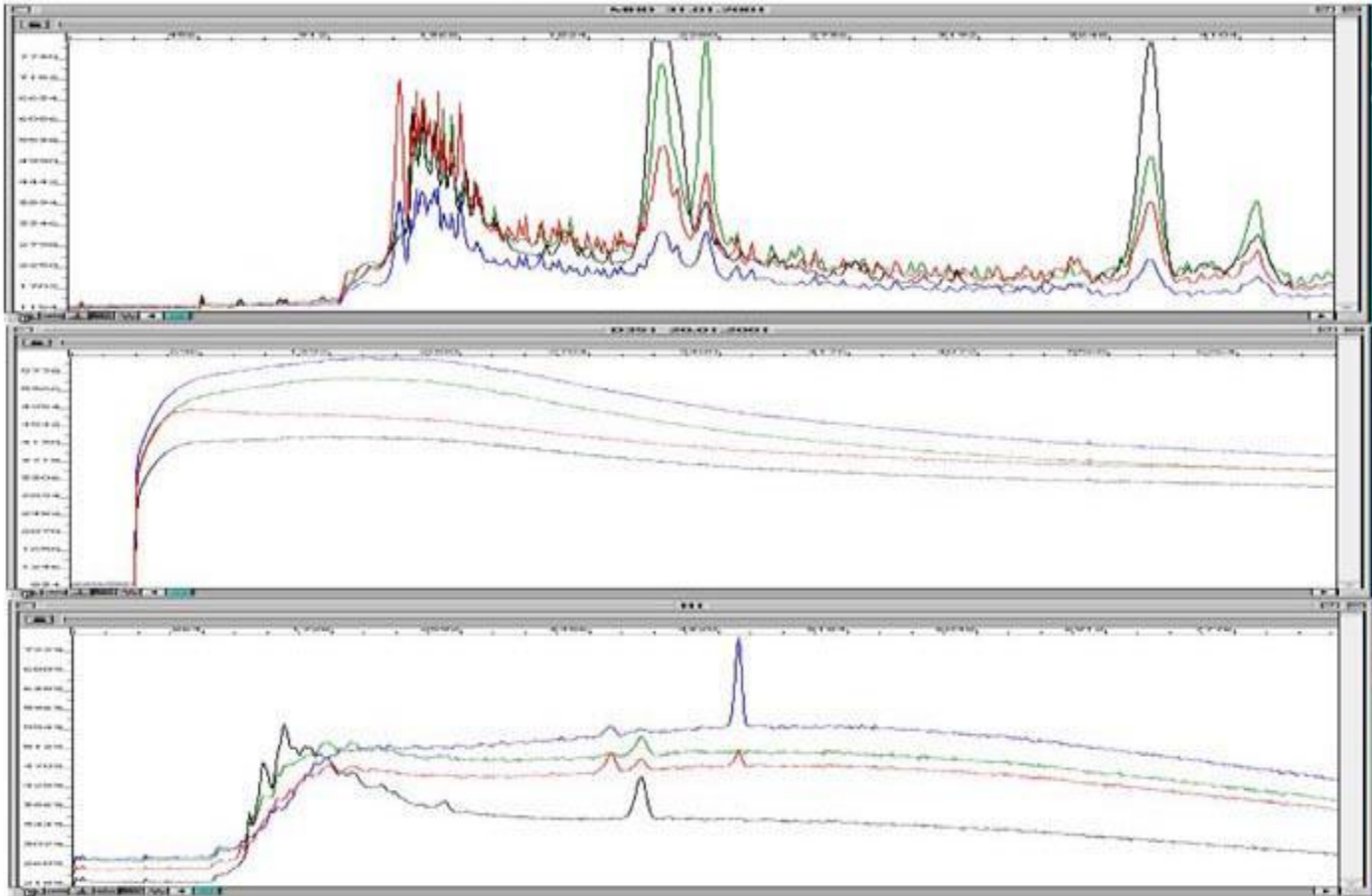
EXTREME CASES



Какие бывают результаты? (продолжение)

Не прошла (или прошла с очень низкой эффективностью) реакция селективизации

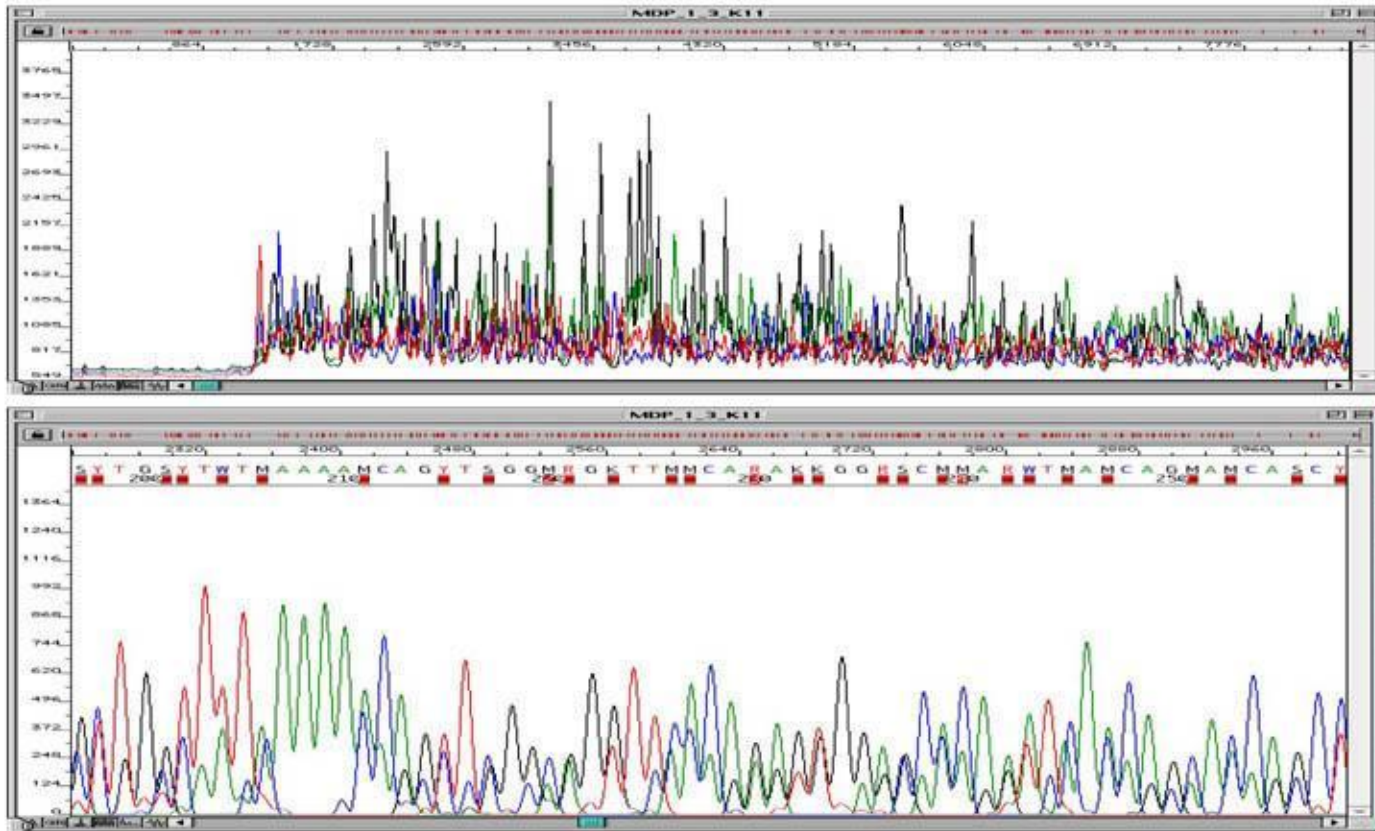
EXTREME CASES



Какие бывают результаты? (продолжение)

В образце присутствует неспецифическая матричная последовательность ДНК

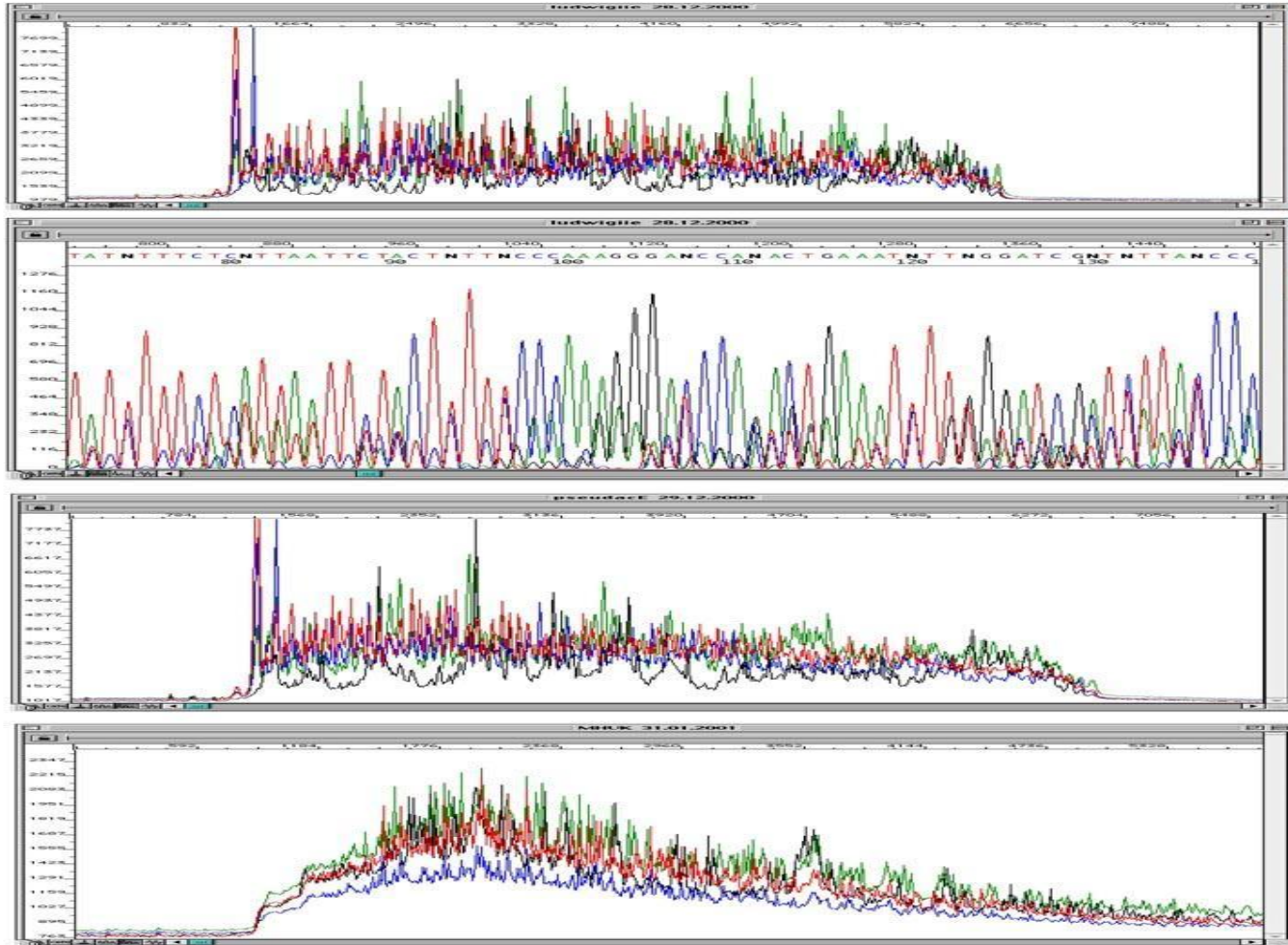
DIRTY SEQUENCE



Какие бывают результаты? (продолжение)

Неспецифические ПЦР-продукты в образце

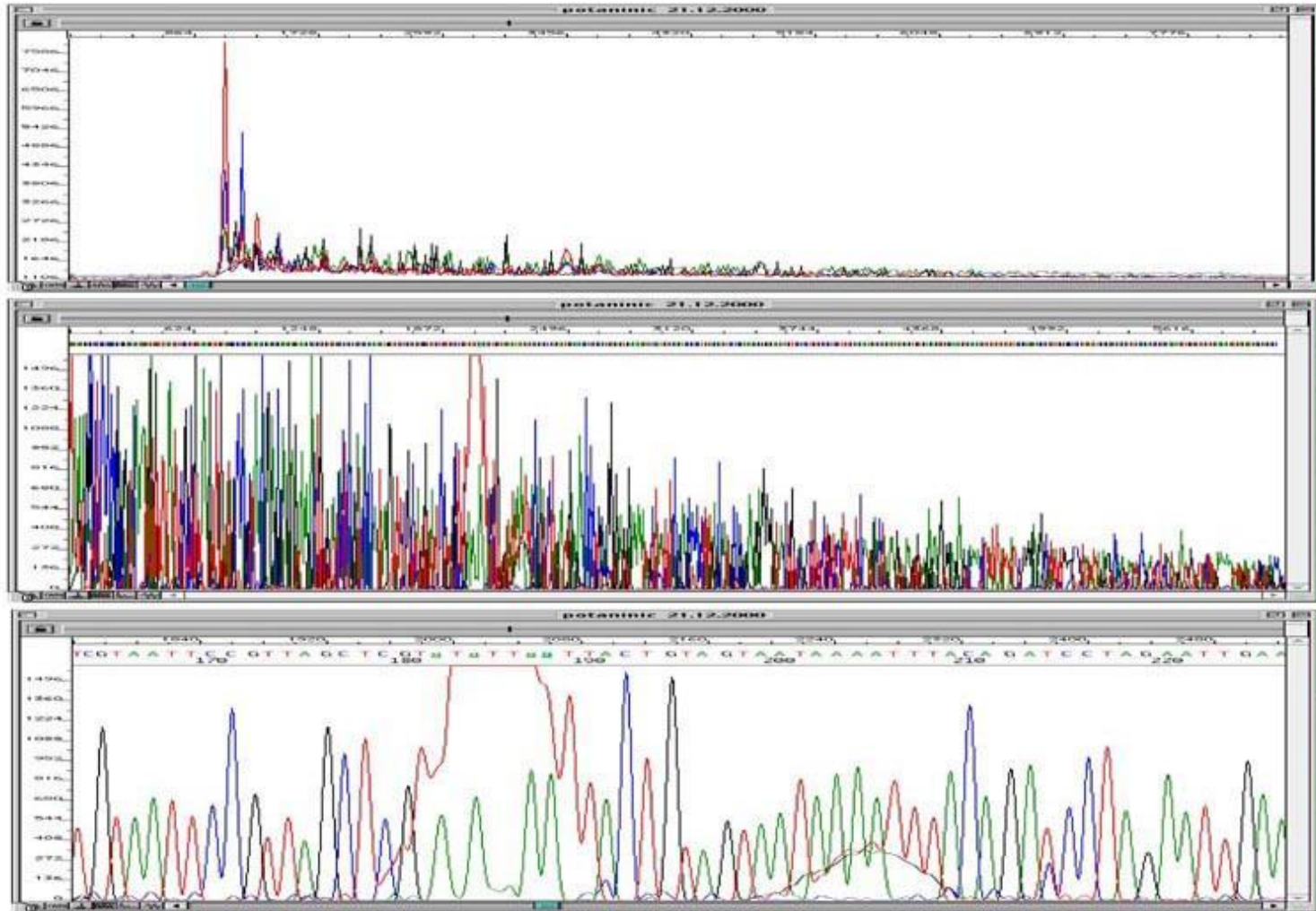
IMPURE AMPLICONS



Какие бывают результаты? (продолжение)

1. Мало ДНК в образце, 2 и 3 – недостаточная очистка от ddNTPs после реакции секвенирования

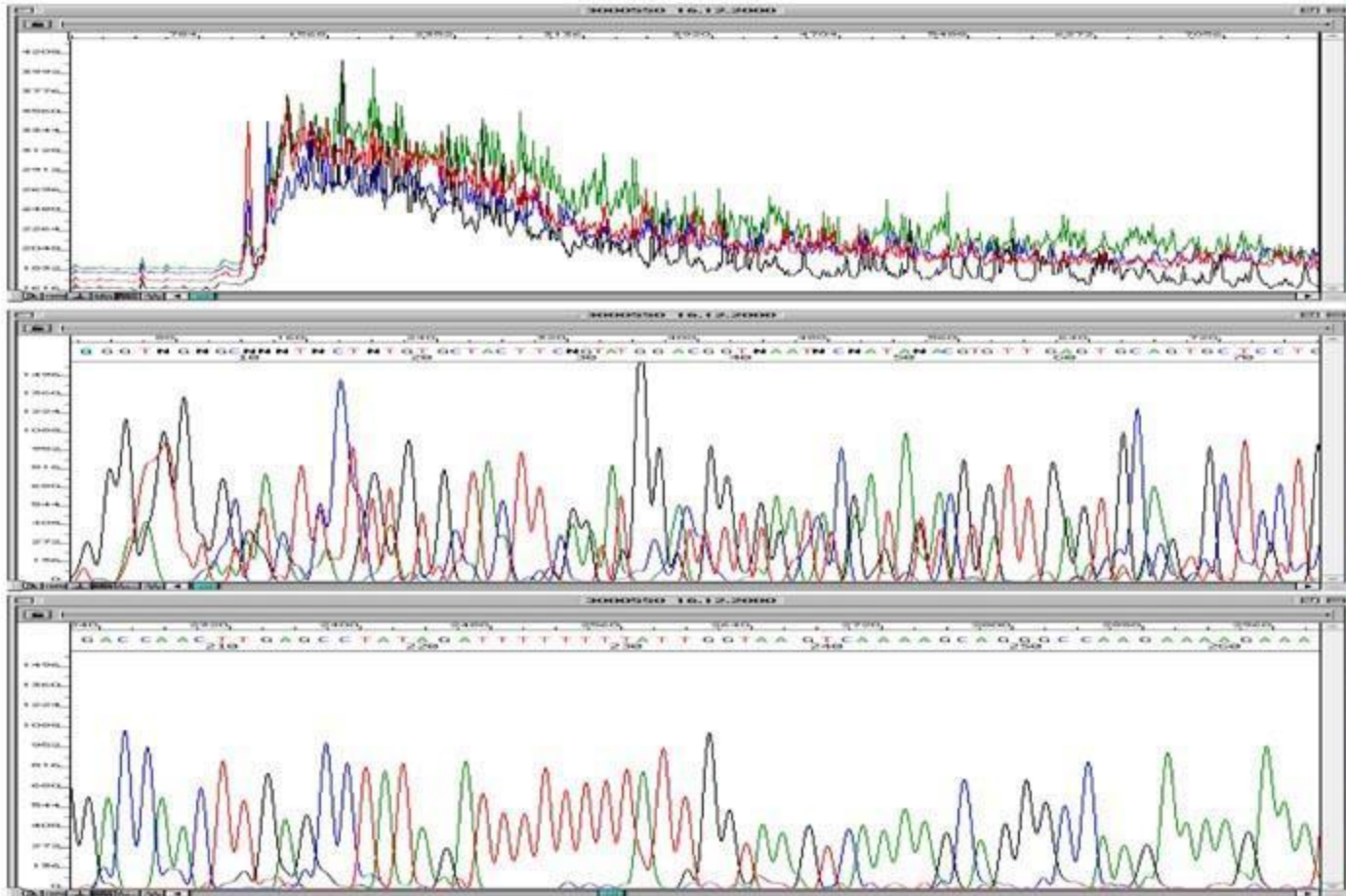
FEW DNA, MANY BD



Какие бывают результаты? (продолжение)

Димеры праймеров или короткая неспецифика в образце

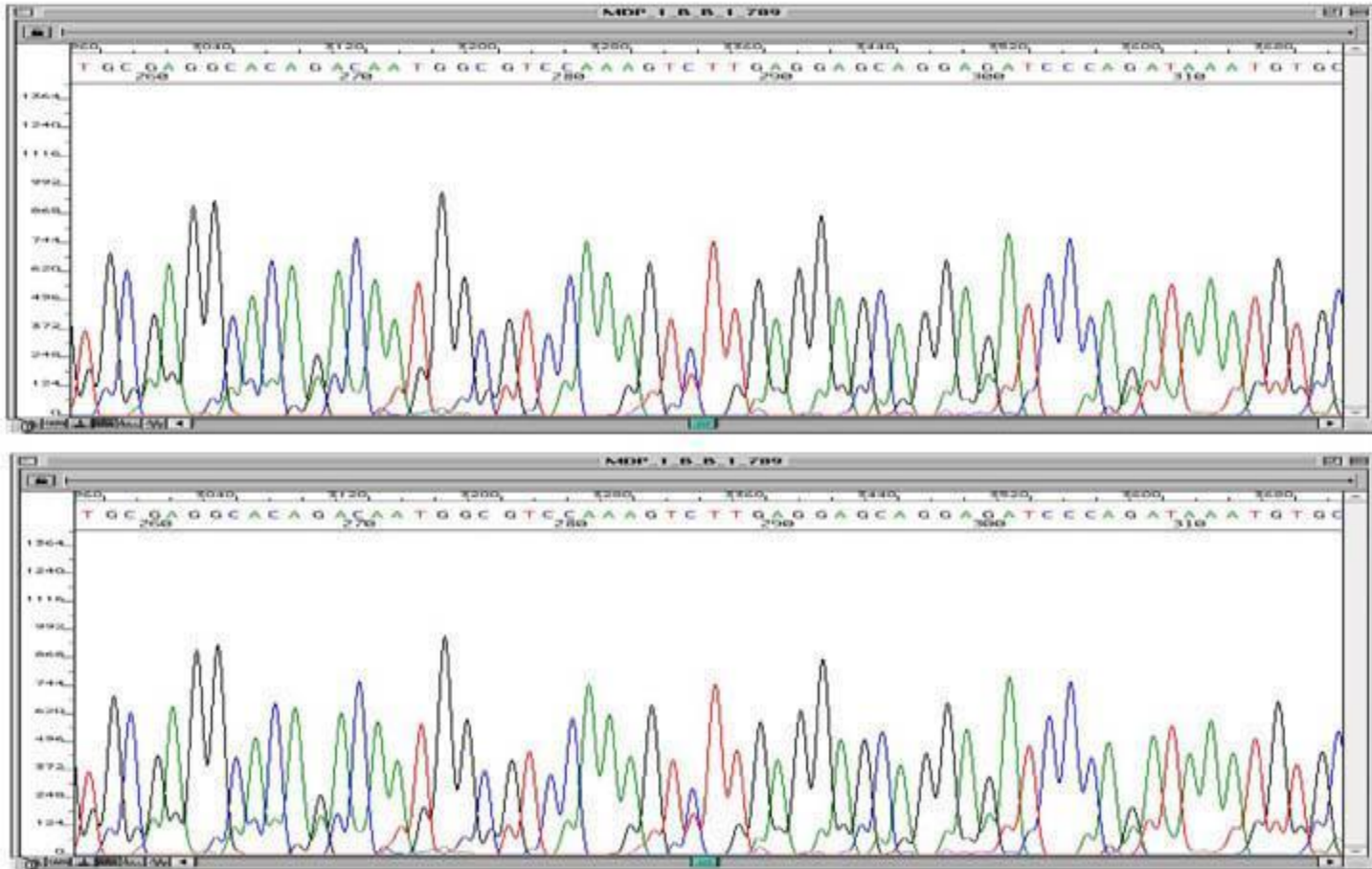
SHORT (PrimerDimers?) IMPURITIES IN PCR



Какие бывают результаты? (продолжение)

В реакции присутствует примесь укороченного праймера для секвенирования

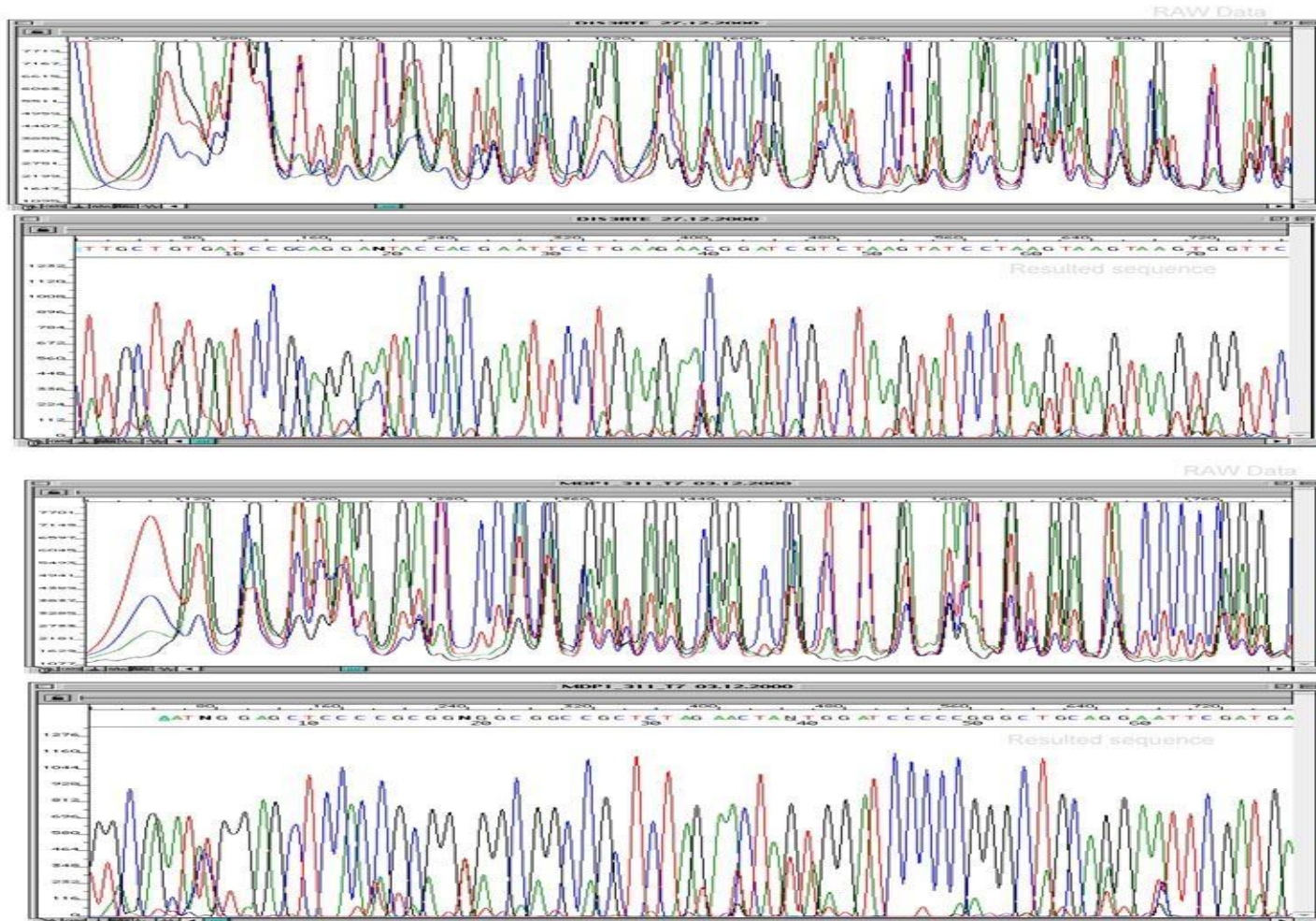
(N-1)+ PRIMER



Какие бывают результаты? (продолжение)

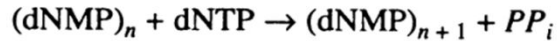
В реакцию секвенирования взято излишнее количество ddNTPs

TOO HIGH SIGNALS (4ul BD)

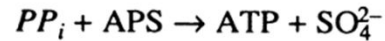


Пиросеквенирование

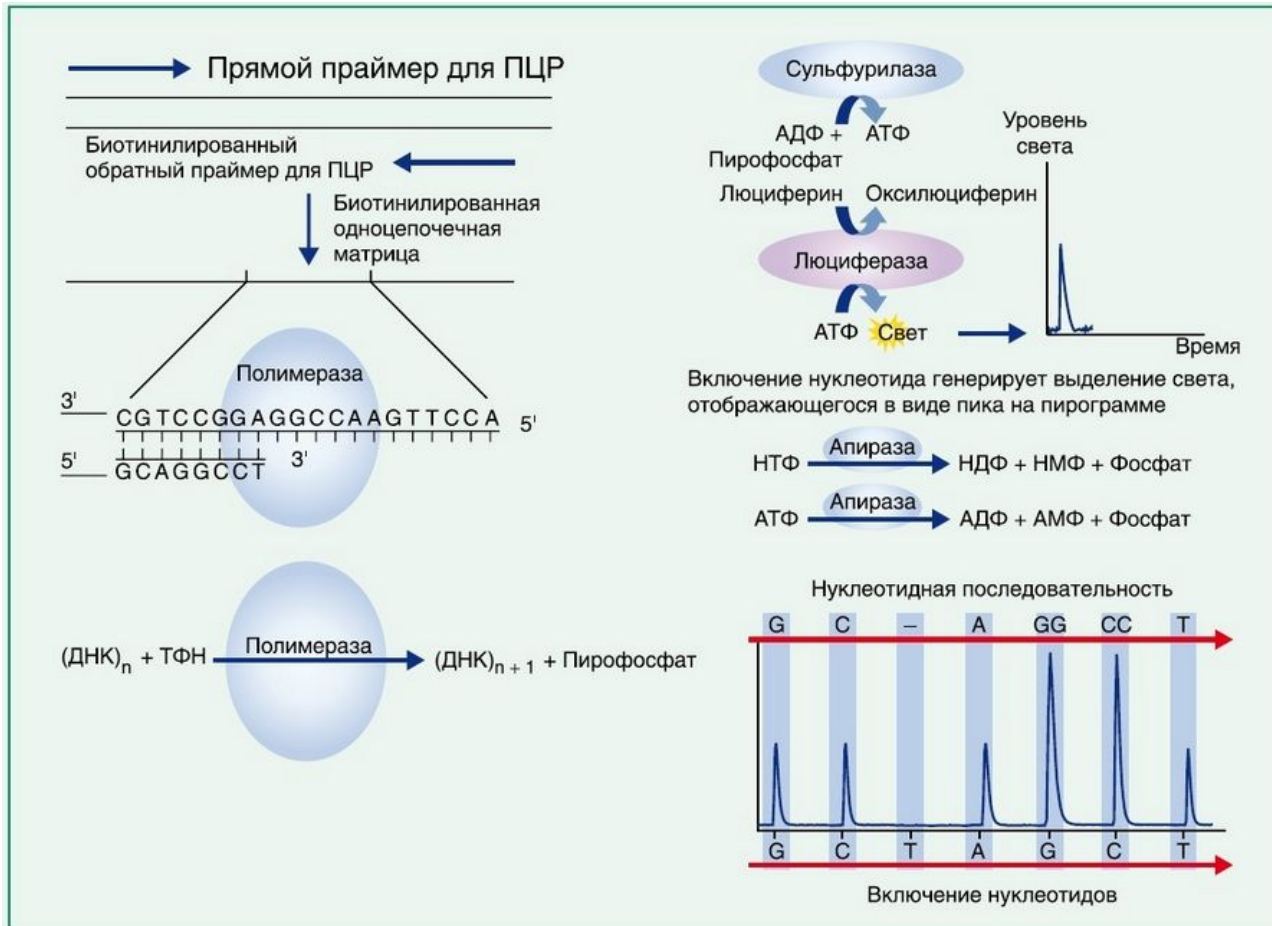
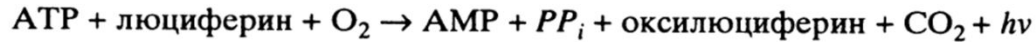
ДНК-полимераза



АТФ-сульфурилаза



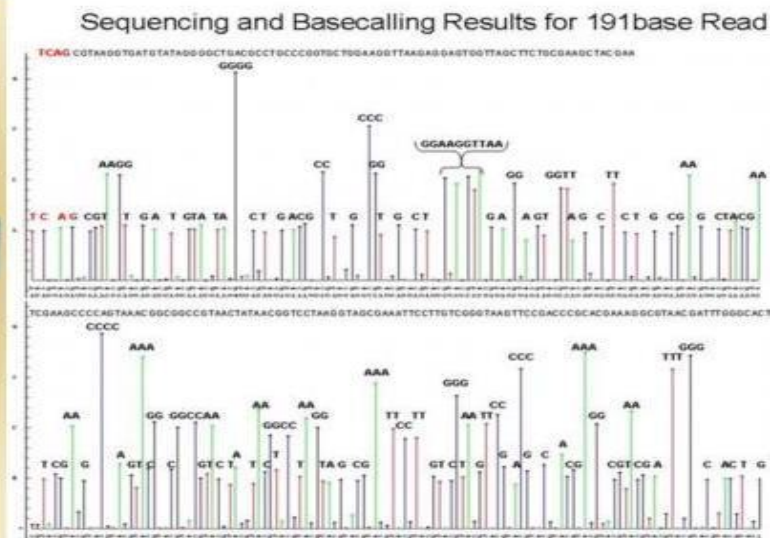
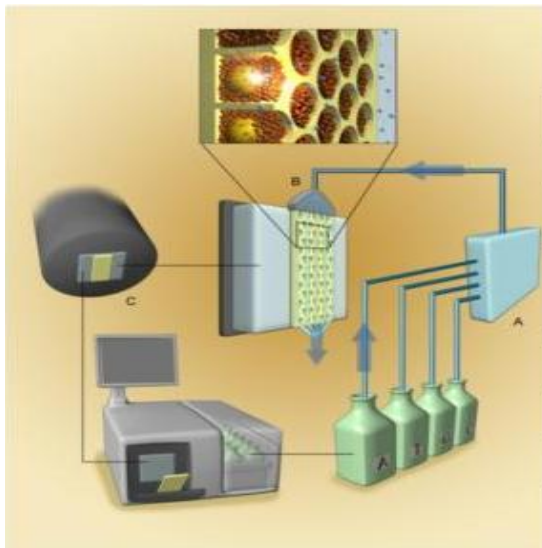
Люцифераза



Современное пиросеквенирование (Roche)

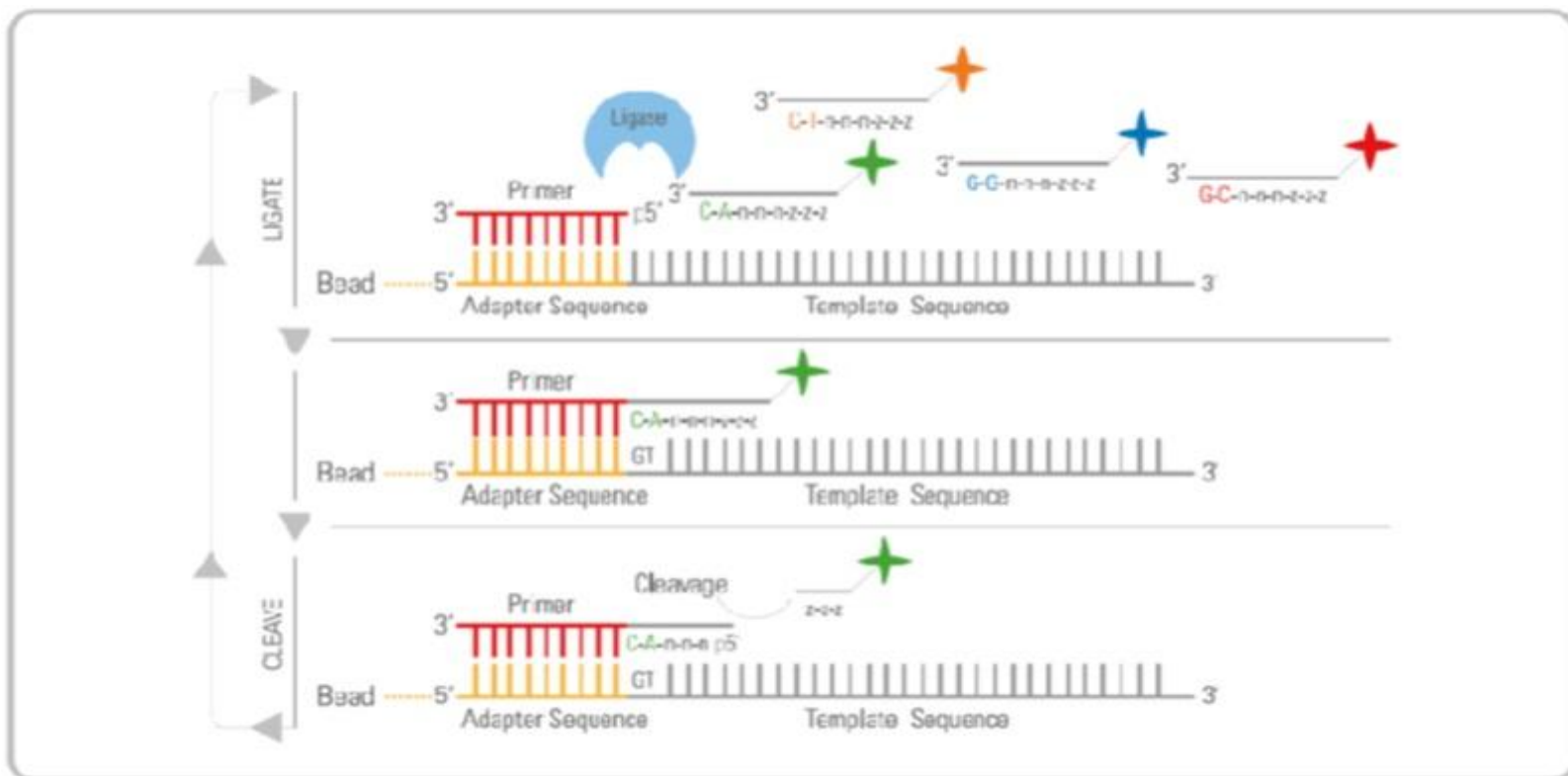
Существенной особенностью более сложной технологии, разработанной компанией "454 Life Sciences", является использование эмульсионной ПЦР для одновременной параллельной подготовки сотен тысяч препаратов ДНК к секвенированию. Такая пробоподготовка состоит из следующих этапов:

- ультразвуковая фрагментация (небулизация) анализируемой ДНК;
- пришивка адапторов и денатурация ДНК;
- получение эмульсии, содержащей в микрокаплях единичные фрагменты ДНК и полистирольные шарики с пришитым праймером;
- проведение эмульсионной ПЦР (emPCR);
- отмывка микрошариков от реагентов и удаление несвязанных с шариками нитей ДНК;
- загрузка шариков в лунки проточной камеры;
- загрузка лунок микрошариками с иммобилизованными ферментами



При пропускании реагентов через проточную ячейку регистрируются люминесцентные сигналы, излучаемые сотнями тысяч микролунок. На димерных, тримерных и тетрамерных нуклеотидных повторах интенсивность сигналов пропорционально увеличивается. Протяжённость секвенируемых участков ДНК может превышать 100 оснований

Секвенирование SOLID с помощью лигирования



Decoding

●	●	●	●	
TA	AC	AA	GA	
GC	CA	CC	TC	
CG	GT	GG	AG	
AT	TG	TT	CT	
AT	TG	GG	GA	
A	T	G	G	A

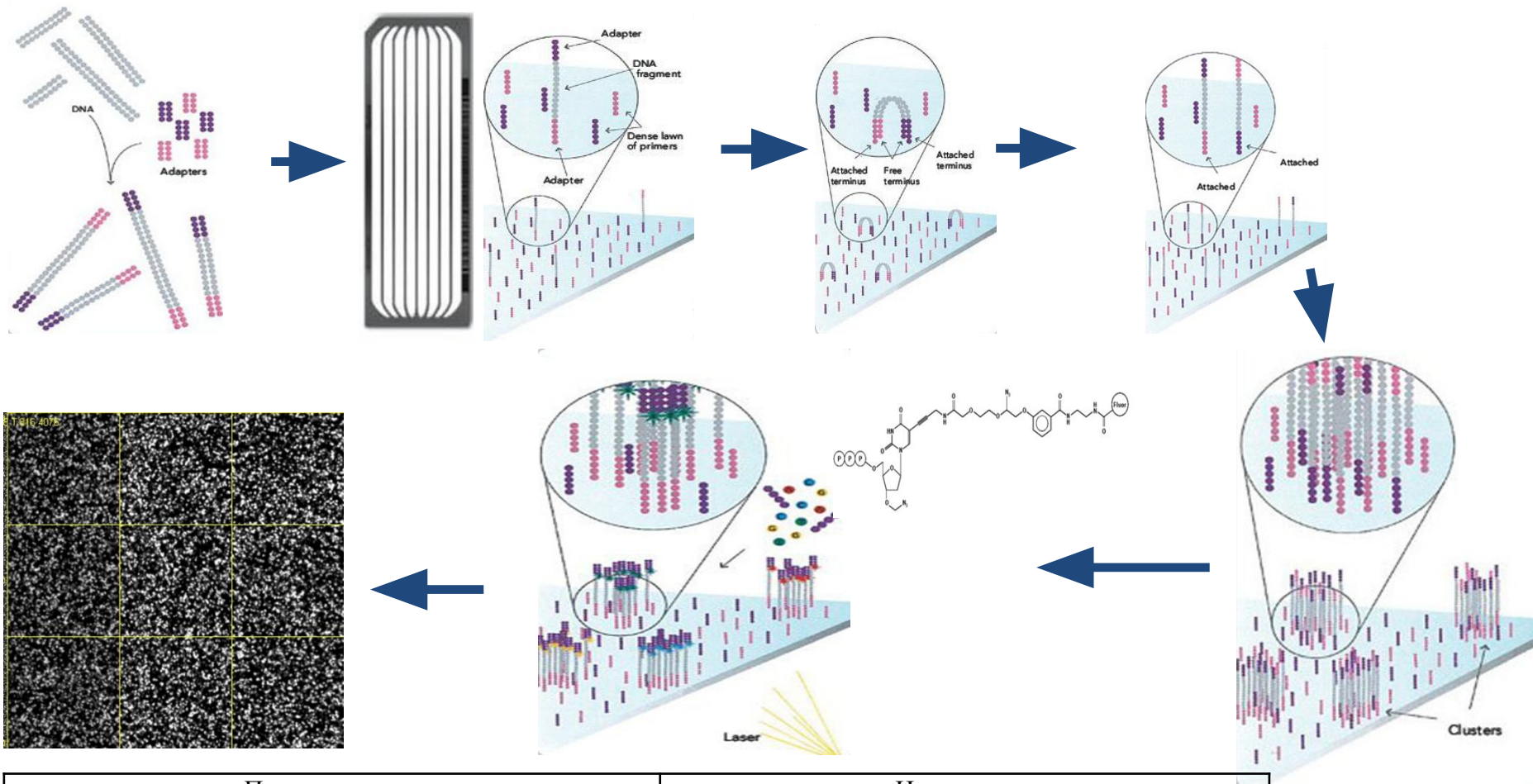
Преимущества:

- высокая точность
- возможность использовать часть дорожек на ячейке

Недостатки:

- очень короткие чтения
- длительность работы
- относительно малая доступность свободного ПО

Секвенирование с помощью синтеза на чипе (Illumina)



Преимущества:

- высокая точность
- универсальность
- доступность ПО для обработки и анализа результатов
- наименьшая цена получаемых данных (в расчете на нуклеотид)

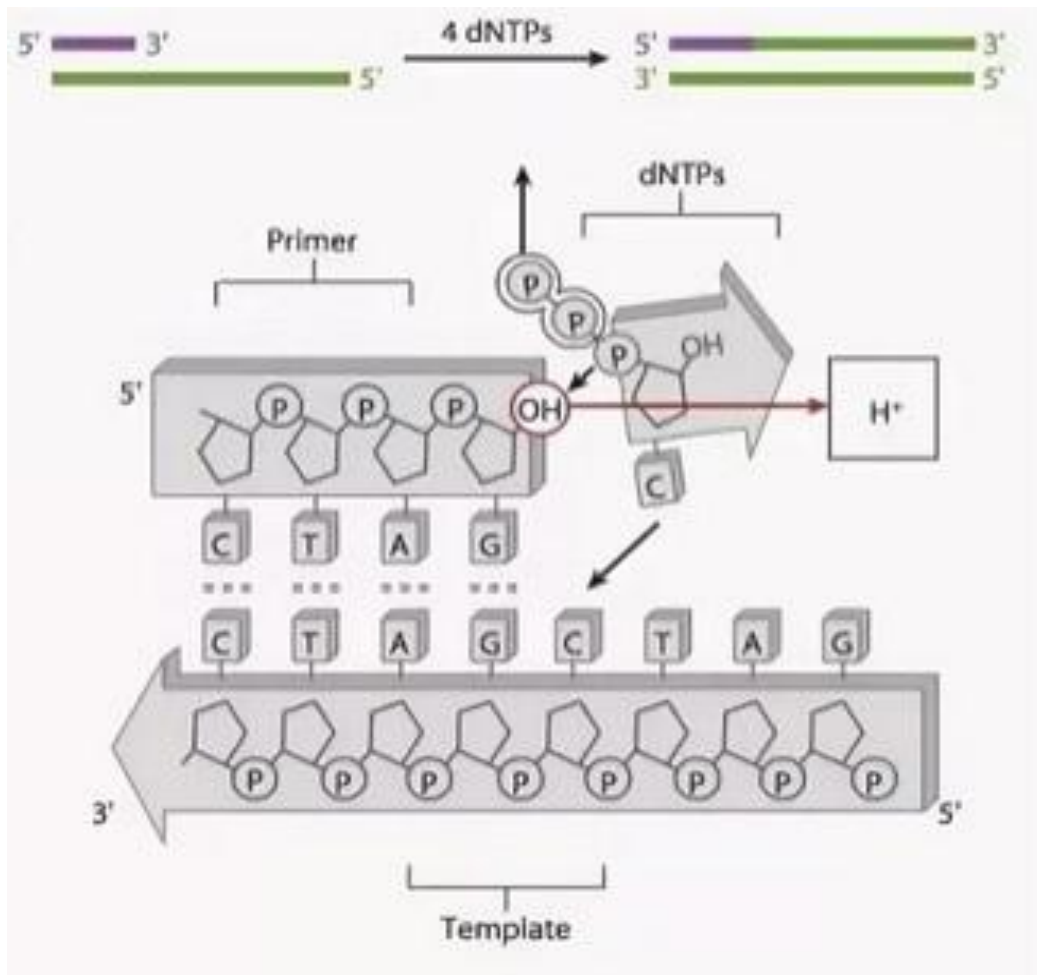
Недостатки:

- высокая цена реагентов
- проблемы с секвенированием матриц с низкой сложностью
- большая длительность прогона
- ошибки в GC-богатых участках

цена за запуск/цена за Мб (в \$)

23 470/0.04

Полупроводниковое секвенирование



Преимущества:

- относительно низкая цена за запуск
- быстрота

Недостатки:

- невысокая точность прочтения гомополимерных участков
- низкая производительность

цена за запуск/цена за Мб (в \$)
939/0.60