

Sekvenování DNA

K sekvenování byly vyvinuty dvě metody – tzv. Maxam-Gilbertova a Sangerova. Sangerova je zdaleka nejpoužívanější metodou a právě na princip této metody se zaměříme

Sangerova metoda

Základem této metody je syntéza nového vlákna DNA založená na přítomnosti jednovláknové DNA, která slouží jako templát pro syntézu druhého vlákna. Syntézu zprostředkovává DNA-polymeráza a syntéza nového vlákna končí ve zcela určitých místech v závislosti na sekvenci vlákna DNA. Délku výsledného nově syntetizovaného vlákna lze zjistit metodou tzv. elektroforézy.

princip:

Reakce probíhá přidáváním nukleotidů ve směru 5´-3´. Nové nukleotidy jsou přidávány pomocí enzymu DNA- polymerázy. K průběhu syntézy je tedy třeba přítomnost jednovláknové DNA(templátu), DNA-polymerázy, nukleotidtrifosfátů (dATP, dCTP, dGTP a dTTP) a dideoxynukleotidtrifosfátů (ddCTP, ddATP, ddTTP, ddGTP).

Nukleotidtrifosfáty obsahují 2-deoxyribózu (tzn. na druhém uhlíku ribózy chybí OH skupina), u dideoxynukleotidtrifosfátů je obsažena 2,3-dideoxyribóza (tzn. na druhém i třetím uhlíku chybí OH skupina).

Při sekvenování DNA se využívají právě tři typy „normálních“ nukleotidů a jeden dideoxynukleotidtrifosfát. Reakce probíhá jako klasická syntéza DNA až do okamžiku, kdy se místo „normálního“ nukleotidu naváže dideoxynukleotid. DNA-polymeráza připojí tento dideoxynukleotid stejným způsobem jako normální nukleotidy. Následně, když bude chtít přiřadit další nukleotid, nebude to možné, jelikož na dideoxynukleotidu chybí OH skupina na 3. uhlíku a proto nemůže dojít k vytvoření fosfodiesterové vazby mezi oběma nukleotidy a syntéza zde končí.

Představme si směs 3 „normálních“ nukleotidů (dATP, dGTP, dTTP) a jednoho dideoxynukleotidu (ddCTP). Syntéza nového vlákna se zastaví vždy v místě, kde se na templátovém vlákně vyskytne báze guanin (DNA-polymeráza samozřejmě připojuje báze podle komplementarity bází, tzn. A na T a C na G)

Následně se úsek rozdělí na gelu (tzv. elektroforézou), pomocí něhož zjistíme délku nově vytvořeného řetězce, známe pozici prvního guaninu v řetězci. Jak ale zjistit pozici dalších guaninů v řetězci?

V praxi se do směsi přidá nejenom dideoxynukleotid, ale také jeho normální partner tedy deoxynukleotid. Představme si, že chceme zjistit umístění guaninu v řetězci. Do směsi přidáme nejenom ddCTP, ale také jeho normálního partnera dCTP. Poměr těchto nukleotidů upravíme tak, že budou v poměru 100 dCTP : 1 ddCTP. Co to znamená? Na jeden ddCTP připadá 100dCTP, tedy pravděpodobnost, že se připojí ddCTP je 1%. Pokud provádíme sekvenaci DNA je ve směsi přítomno více templátových vláken a syntéza tak probíhá na všech z nich, máme tak k dispozici velké množství templátů. Když se DNA-polymeráza dostane do místa, kde je na templátu přítomný guanin je pravděpodobnost pouze 1:100, že se připojí ddCTP a tím pádem by v tomto místě došlo k přerušení syntézy. Pokud se však připojí dCTP syntéza dále pokračuje až do okamžiku, kdy by se připojil ddCTP. Tímto způsobem dostáváme směs velkého množství nově syntetizovaných řetězců, které všechny končí na guaninu. Seřadíme-li je podle velikosti, dostaneme velice jasnou představu o tom, v jakých místech se daná báze (v našem příkladě guanin) nalézá. Stejným způsobem lze postupovat u adeninu, thyminu či cytosinu. Touto metodou zjistíme pořadí bází v řetězci.

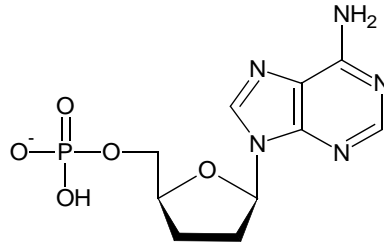
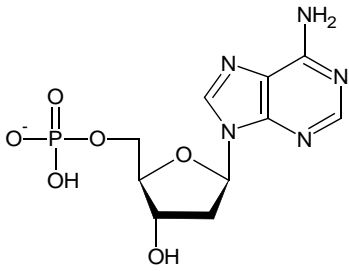
Proč se vlastně sekvenování provádí a jaké je jeho využití? Některé choroby mají genetický základ. Proto, když budeme schopni porovnat genetickou informaci zdravého a

nemocného člověka, zjistíme odlišný úsek DNA, který může být zodpovědný za onu chorobu. Proto by se v budoucnu mohlo této metody využívat např. při genové terapii.

Otázky:

- 1) Jak se liší Sangerova metoda sekvenování DNA od klasické syntézy DNA při replikaci?
- 2) Napiš rozdíl mezi deoxynukleotidtrifosfátem a dideoxynukleotidtrifosfátem?
- 3) Jaký je praktický význam sekvenování DNA?
- 4) Co se stane po připojení dideoxynukleotidtrifosfátu na templátové vlákno DNA?
- 5) Uveďme si modelovou situaci, kdy dochází k syntéze nového vlákna DNA (Sangerovou metodou), ve směsi jsou přítomny všechny potřebné látky a dATP, dCTP, dGTP a ddTTP. Na které bázi templátového řetězce dojde k ukončení syntézy nového vlákna? U které báze zjistíme její zařazení v řetězci?
- 6) Představ si, že jsi vědec, který chce osekvenovat řetězec DNA. Laborant ti přinese směs, která obsahuje templátové řetězce DNA, deoxynukleotidtrifosfáty a dideoxynukleotidtrifosfáty. Pracoval laborant správně, při přípravě této směsi? Dojde k syntéze nového řetězce DNA? Máš k dispozici všechny složky, které k reakci potřebuješ? Pokud ne, napiš, která ze složek ve směsi chybí.
- 7) Z jakého důvodu dojde k ukončení syntézy nového vlákna DNA po připojení dideoxynukleotidtrifosfátu? Proč nedojde k navázání dalšího nukleotidu?

- 8) Urči, který z obrázků znázorňuje dideoxynukleotidtrifosfát a který deoxynukleotidtrifosfát.



- 9) Která ze složek směsi je při syntéze nového vlákna DNA zodpovědná za nasedání jednotlivých nukleotidů?

- 10) Z jakého důvodu se při sekvenaci DNA přidává do směsi jak dideoxynukleotid tak jeho partner deoxynukleotid? Například je ve směsi přítomen dCTP i ddCTP.