

Sequenciamento de DNA

Sequenciamento de DNA permite determinar a ordem das bases nitrogenadas adenina (A), guanina (G), citosina (C) e timina (T) da molécula de DNA



O RNA, geralmente, não é sequenciado diretamente. Tem que ser convertido em cDNA (DNA complementar) pela transcrição reversa com a transcriptase reversa.

Métodos de sequenciamento de DNA

- Método de Maxam e Gilbert: degradação química seletiva e sequencial de nucleotídeos
- Método de Sanger: terminação controlada da síntese de DNA com didesoxirribonucleotídeos (ddNTP)
- Metodologias de sequenciamento de alto desempenho (Next Generation Sequencing, NGS ou High-Throughput Sequencing, HTS)



The Nobel Prize in Chemistry 1980

Paul Berg, Walter Gilbert, Frederick Sanger

The Nobel Prize in Chemistry 1980

Nobel Prize Award Ceremony

Paul Berg

Walter Gilbert

Frederick Sanger



Paul Berg



Walter Gilbert



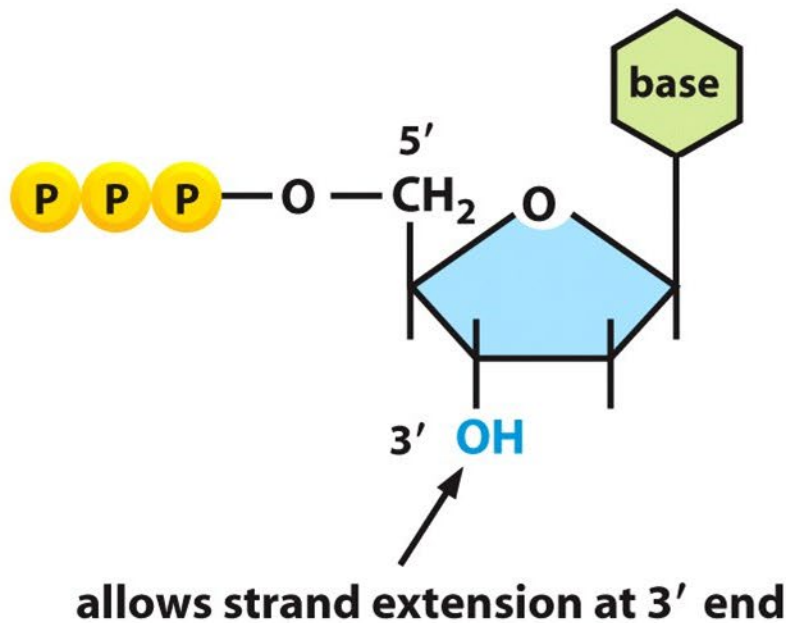
Frederick Sanger

The Nobel Prize in Chemistry 1980 was divided, one half awarded to Paul Berg *"for his fundamental studies of the biochemistry of nucleic acids, with particular regard to recombinant-DNA"*, the other half jointly to Walter Gilbert and Frederick Sanger *"for their contributions concerning the determination of base sequences in nucleic acids"*.

Método de Sanger (ou de terminação de cadeia com didesoxirribonucleosídeos trifosfato)

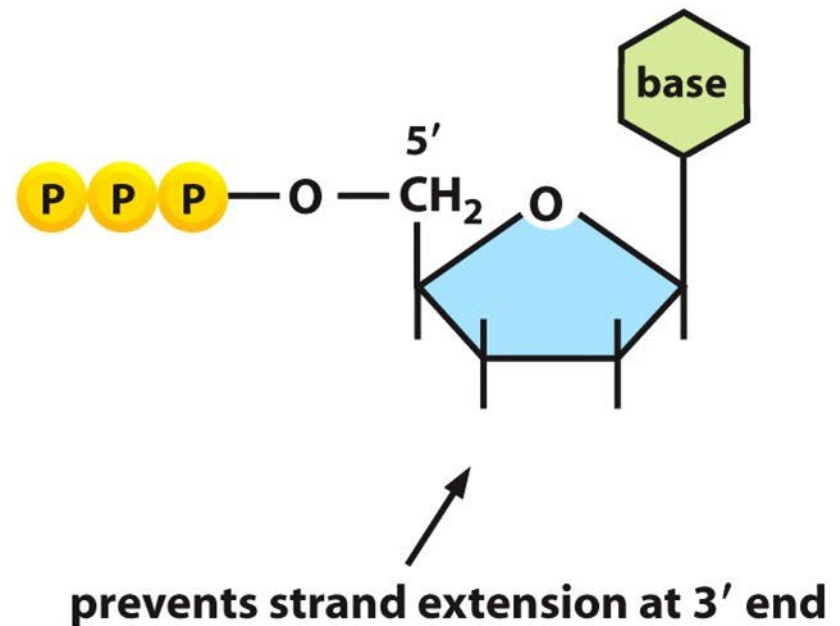
- Método foi desenvolvido em 1977.
- O método utiliza DNA polimerase, primer, ddNTPs e dNTPs.

deoxyribonucleoside triphosphate



(dNTPs)

dideoxyribonucleoside triphosphate



(ddNTPs)

Lembrando que a reação da DNA Polimerase, na replicação, utiliza dNTPs → síntese de DNA

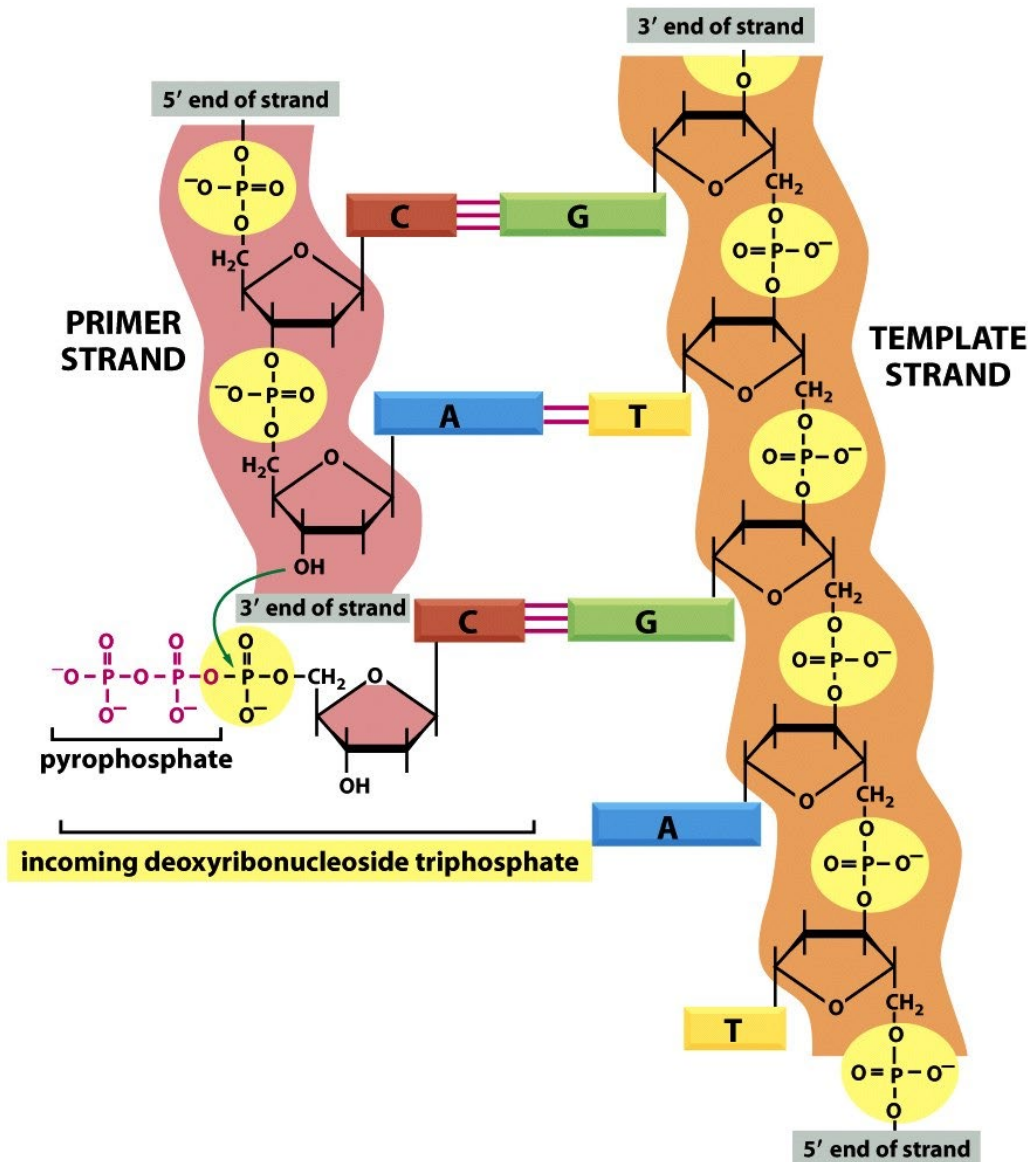
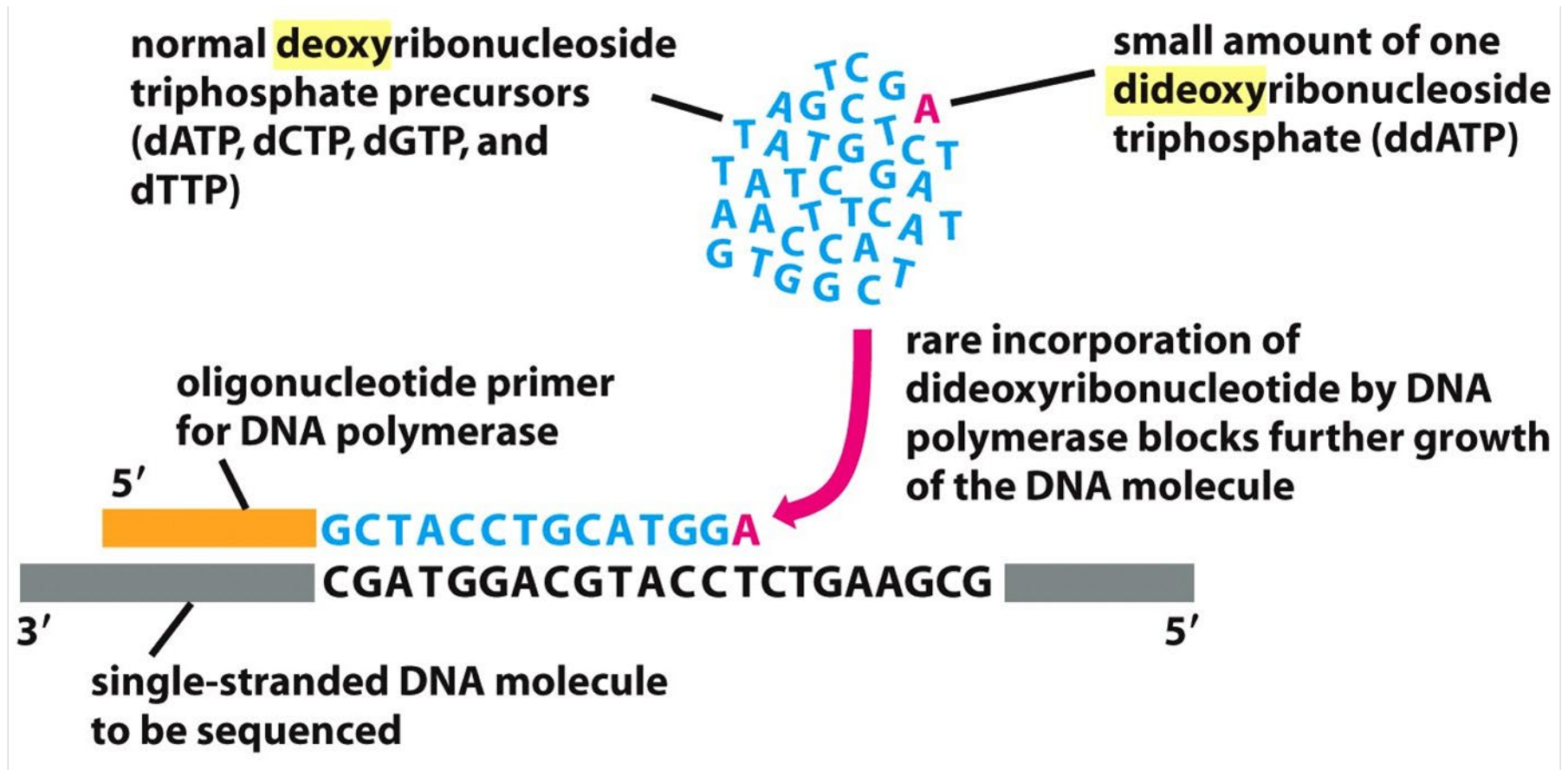


Figure 5-3 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)



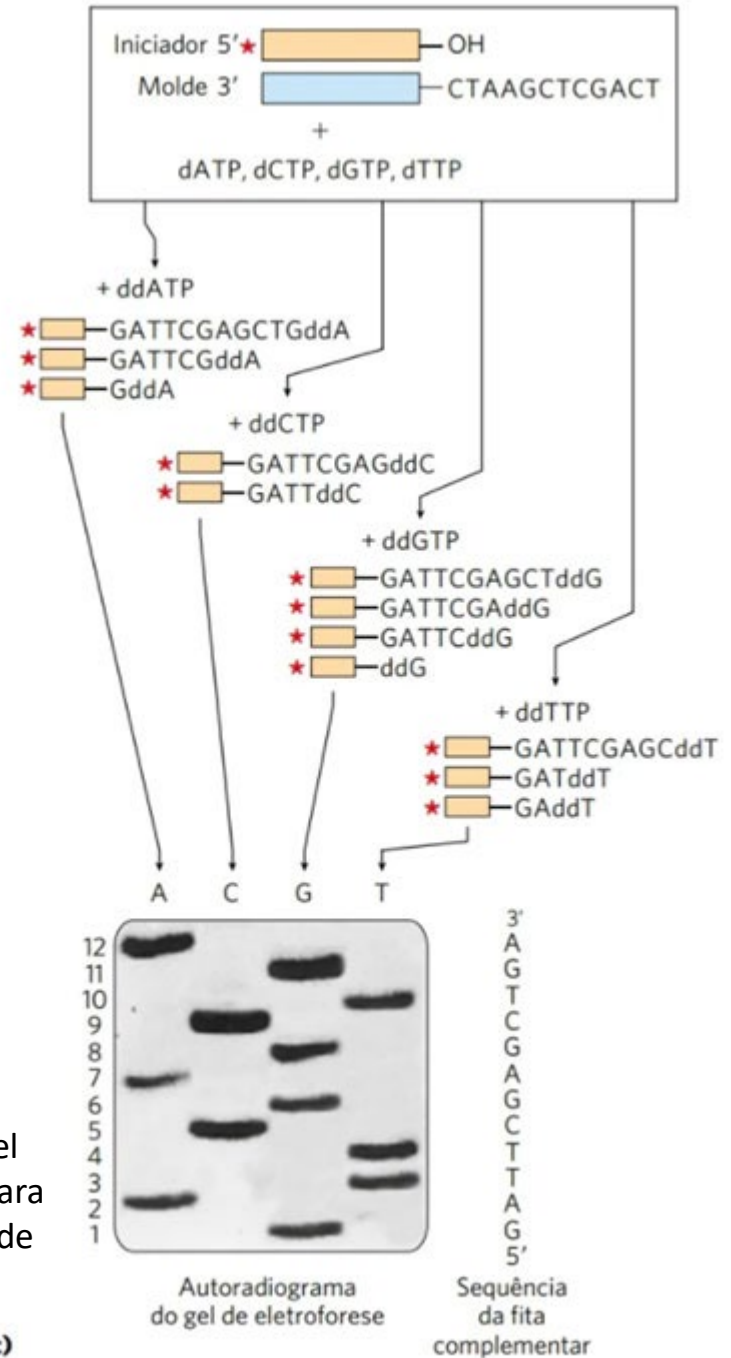
Após a incorporação do ddNTP ocorre a inibição da síntese da cadeia.

Método de Sanger “Clássico”:
 terminação controlada da síntese
 de DNA com
 didesoxirribonucleotídeos
 (e uso do iniciador (primer)
 radiativo*)

Sequenciamento de até
 1000 bases em uma
 reação, utilizando-se
 eletroforese em géis
 longos (60 cm)

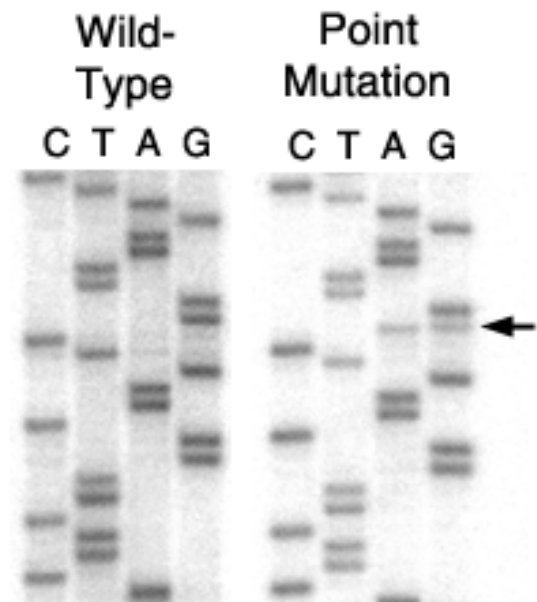
Autorradiografia do gel
 em filme de Raios-X para
 detecção das cadeias de
 DNA radiativas

(c)





Frederick Sanger



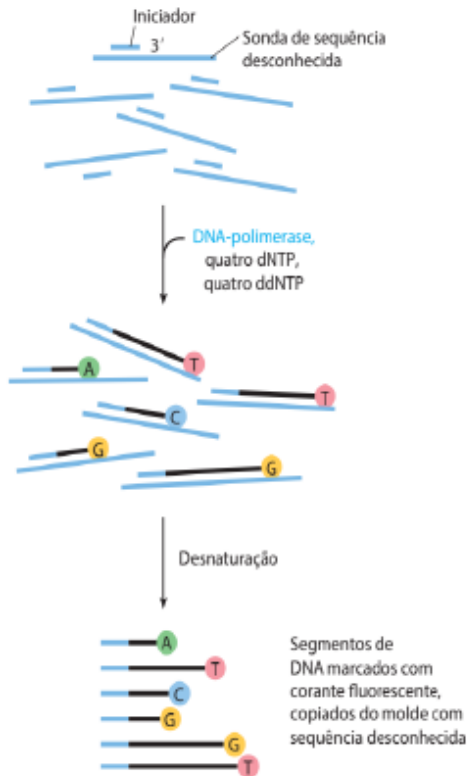
A automatização do sequenciamento pelo Método de Sanger foi possível a partir da utilização de terminadores ddNTPs acoplados a grupos (corantes) fluorescentes

Vantagens:

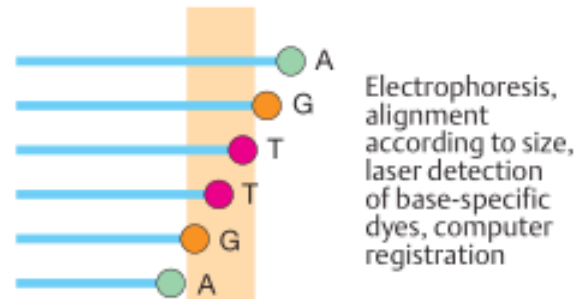
- Uso de reagentes fluorescentes ao invés de radioativos
- Eletroforese capilar ao invés de gel de poliacrilamida
- Detecção por fluorescência emitida por excitação com laser
- “Leitura” digital

Sequenciamento automático de Sanger

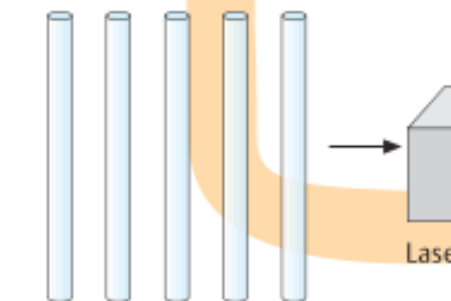
Cada ddNTP possui um fluoróforo de cor diferente.



● ddATP ● ddCTP
1. ddNTPs each with different fluorescent label

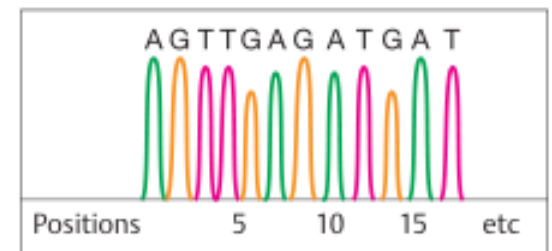


2. Sequencing reactions

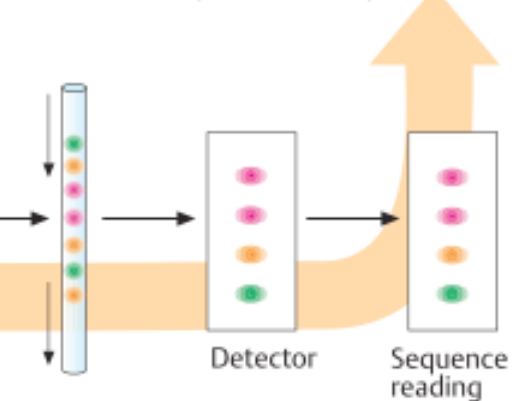


3. Automated sequencing capillaries

● ddGTP ● ddTTP



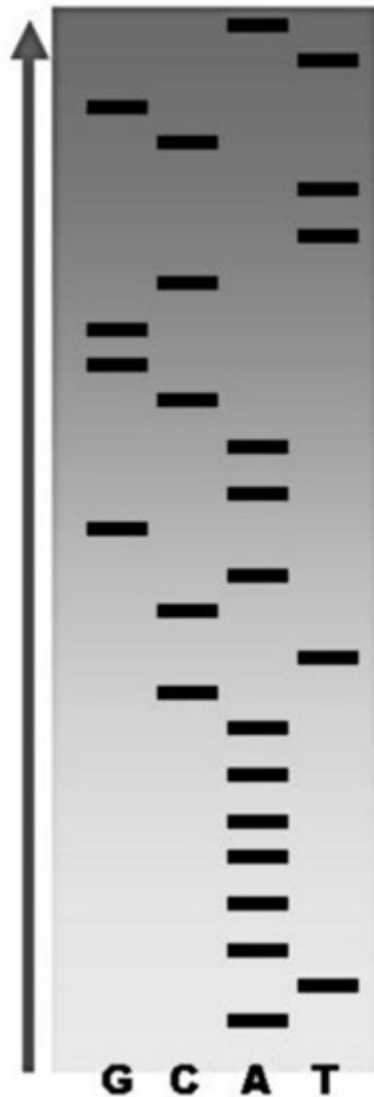
4. Automated printout of sequence



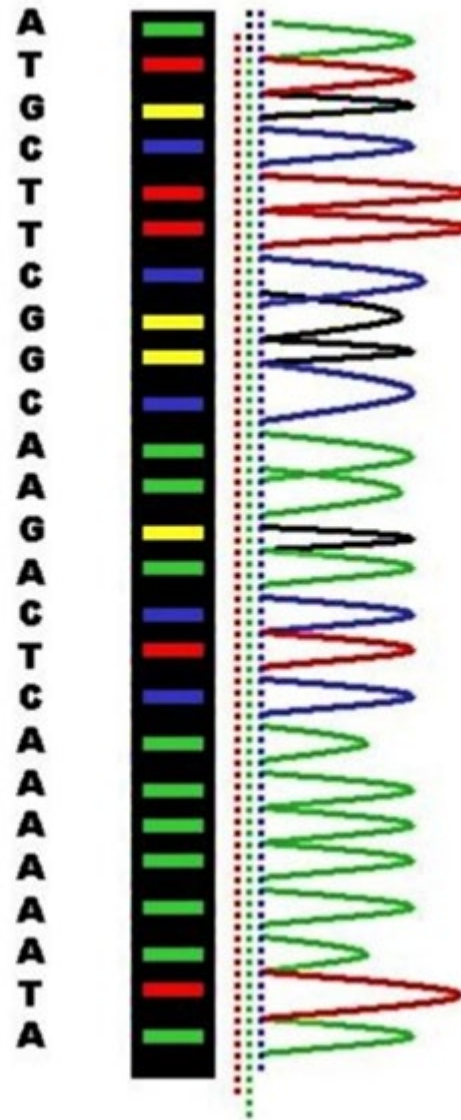
SECUENCIADOR AUTOMÁTICO



Método Clássico
(radiativo, 4 tubos
de reação)



Método Automatizado
(fluorescente,
1 tubo de reação)



- Sequenciamento automático de Sanger (1ª geração).
- Tecnologias desenvolvidas após esta são conhecidas como sequenciamento de nova geração.

Next Generation Sequencing, NGS ou High-Throughput Sequencing, HTS

Metodologias de sequenciamento de alto desempenho, geram milhões e até bilhões de sequências, rapidamente

Next generation sequencing (sequenciamento de nova geração)



Ion Proton



Ion PGM



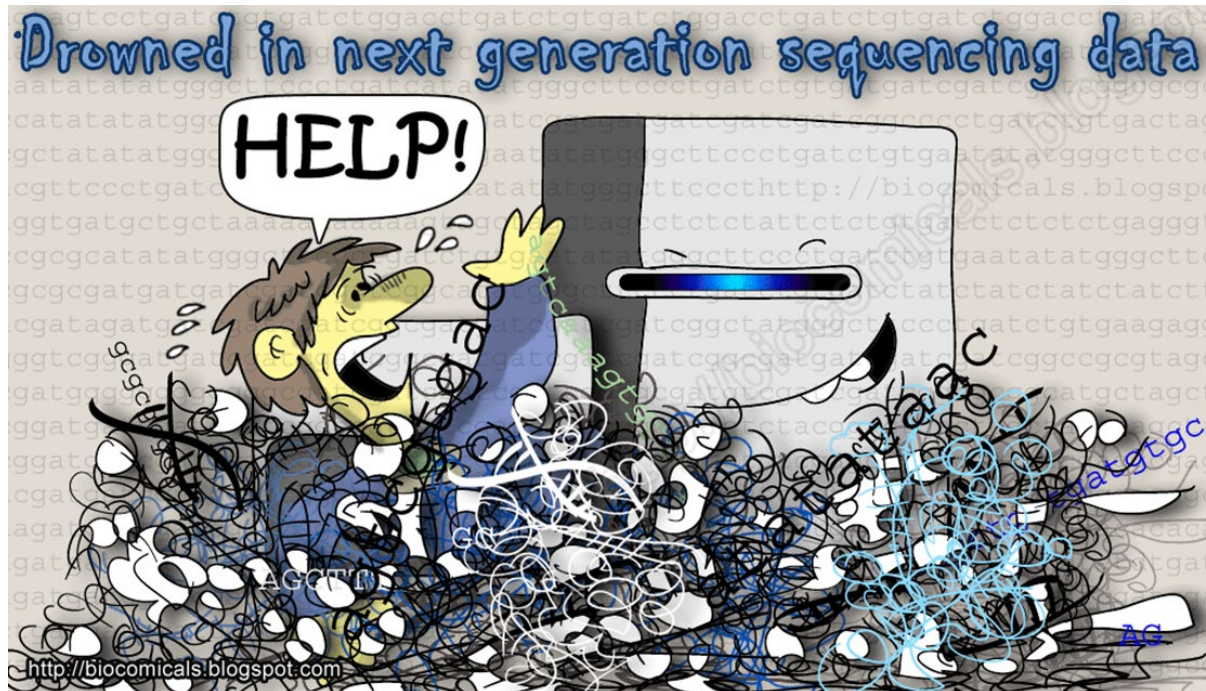
Illumina MiSeq



Roche 454 GS-FLX



Oxford Nanopore
MinION

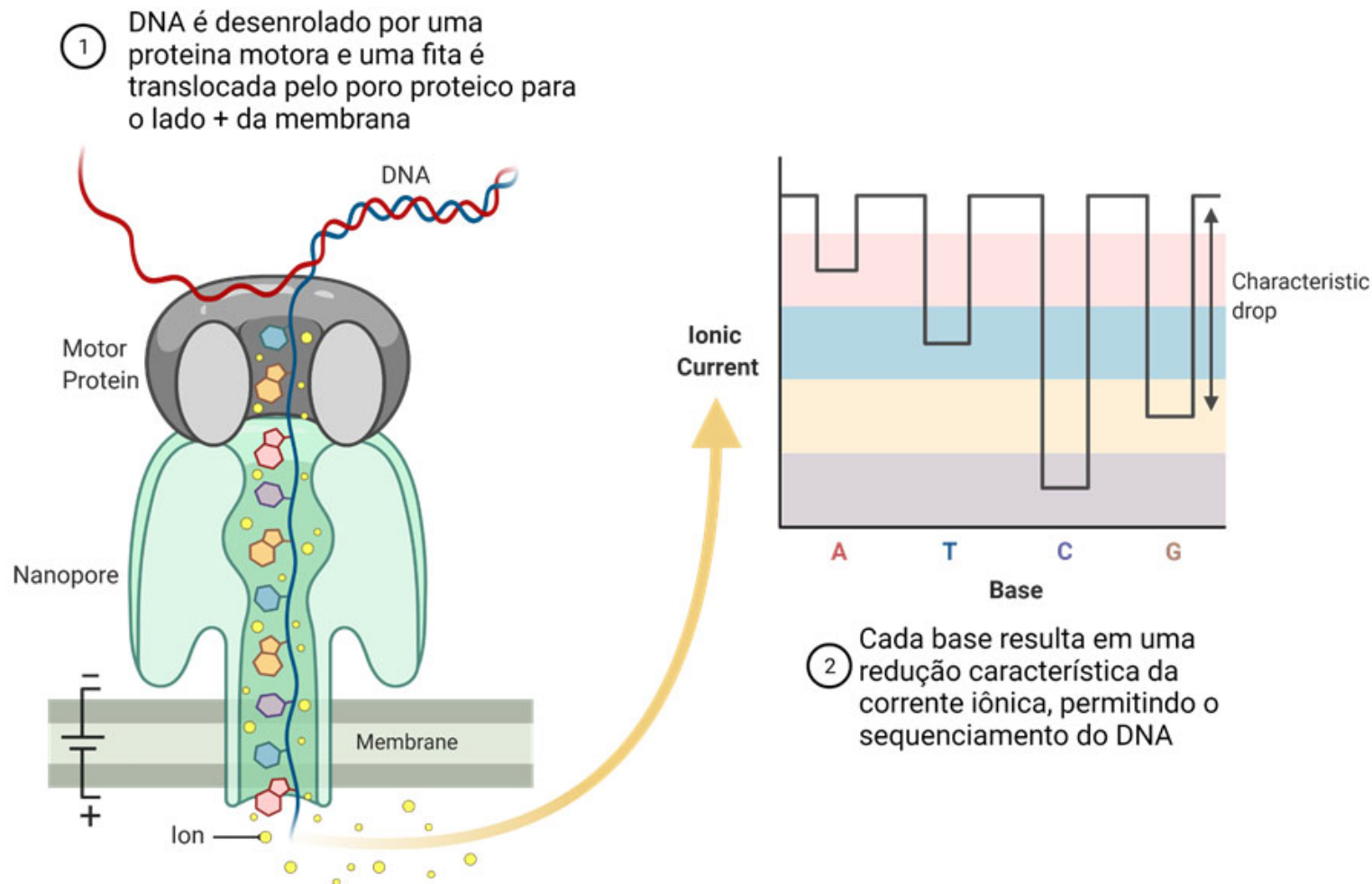


Bioinformática!!

Tecnologia	Química do Sequenciamento	Tipo de preparação do molde de DNA	Tamanho das sequências (nucleotídeos)	Número de sequências geradas/corrida	Taxa de erro	Duração da corrida
Illumina	Síntese com DNA polimerase e detecção da fluorescência de dNTPs liberada na síntese	Amplificação por ponte	150- 300	25×10^6 a 6×10^9	0,15%	11-48h
Pacific Bioscience (PacBio)	Síntese com DNA polimerase e detecção da fluorescência de dNTPs liberada na síntese	Não utiliza PCR Sequenciamento direto do fragmento de DNA	20.000- 40.000	50×10^3	0,1%	30h
Oxford Nanopore (MinION)	Leitura da sequência de DNA enquanto a fita atravessa um nanoporo proteico e causa mudança de condutância	Não utiliza PCR Sequenciamento direto do fragmento de DNA	10.000 - 300.000	600×10^3	10%	1-48h

Nanopore sequencing™ – Oxford Nanopore - MinION

Sequenciamento de moléculas únicas com até 300 Kbp



Aplicações do sequenciamento de DNA

- Obter a sequência completa de fragmentos de DNA (produtos de PCR (amplicons), clones de DNA, plasmídeos, etc)
- Obter a sequência de regiões de interesse de genomas (éxons, gene do rRNA16S, etc)
- Obter a sequência de genomas completos (Sequenciamento de Genomas)
- Obter a sequência de transcritos (RNA) (Sequenciamento de Transcritomas)

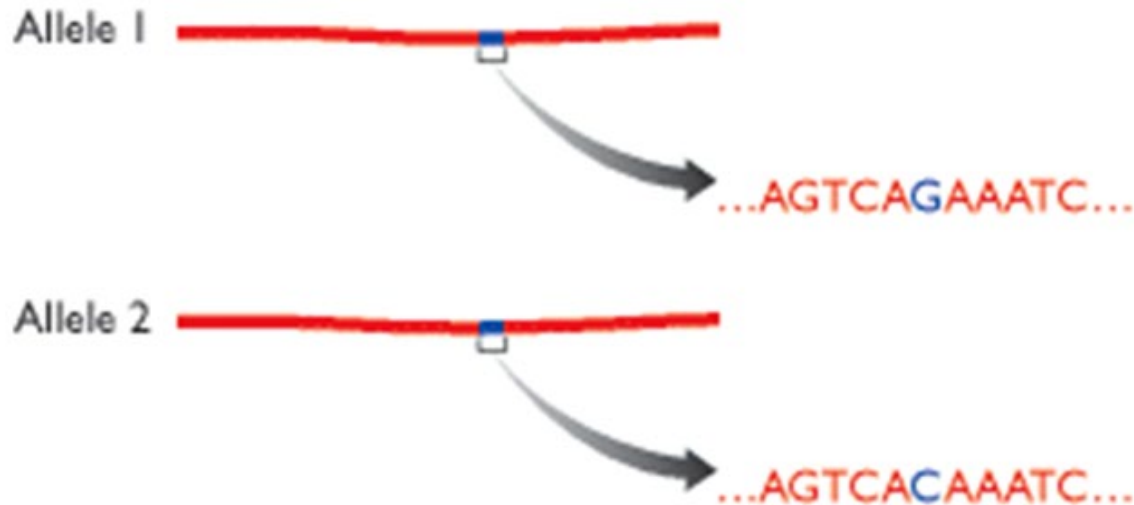
Necessário obter cDNA por transcrição reversa antes do sequenciamento

Variações na sequência genômica entre indivíduos

SNPs

(*Single Nucleotide Polymorphisms*)

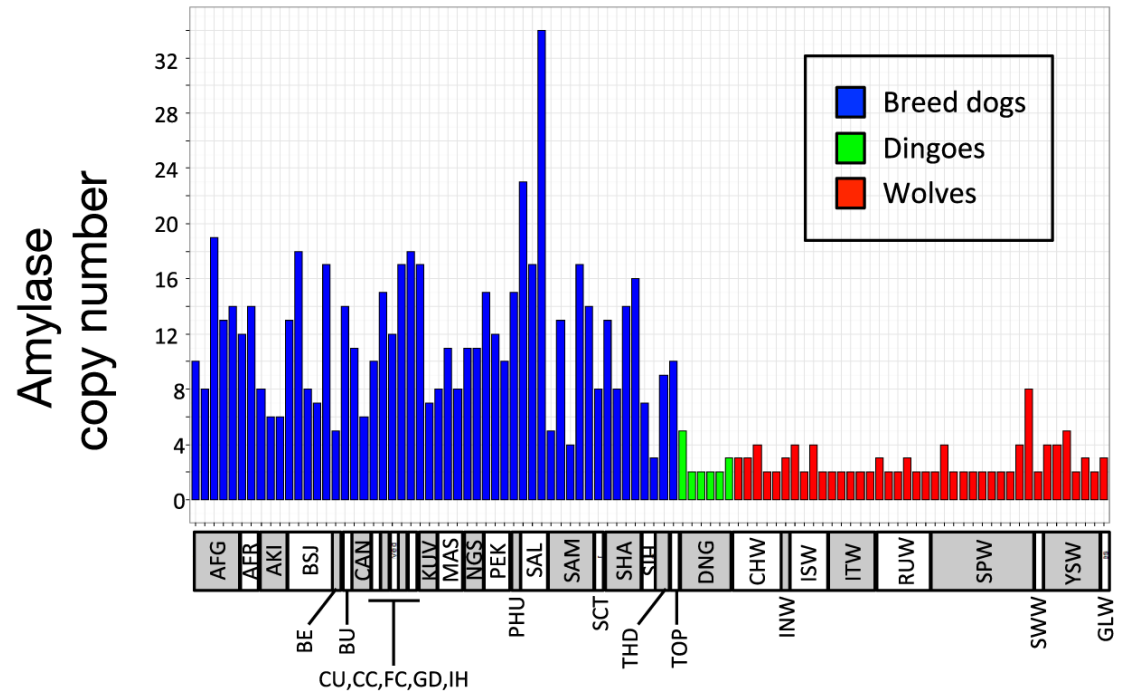
(Polimorfismos de um Único Nucleotídeo)



- Variação na sequência de DNA onde apenas um nucleotídeo difere;
- Para ser considerado SNP deve estar presente em pelo menos 1% da população

Expansão no número de cópias do gene da amilase em cães

Enquanto lobos apresentam em média 2 cópias do gene para amilase, cães apresentam números maiores



• <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1004016>