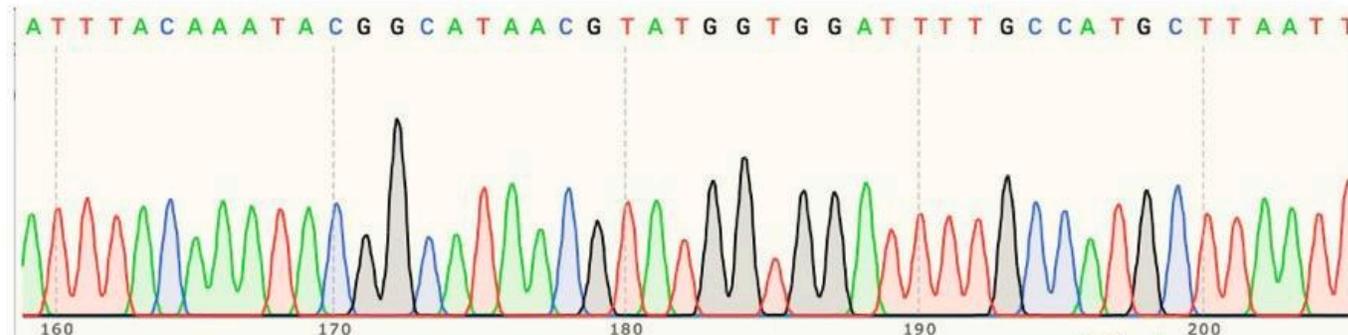




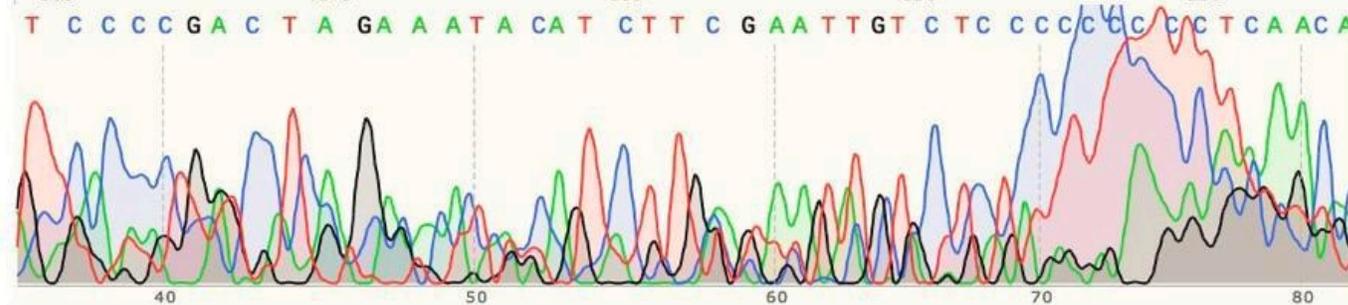
QBQ0317 – 2020

Sequenciamento do DNA

My plans



2020



Métodos de Sequenciamento do DNA

- Maxam e Gilbert (1976)

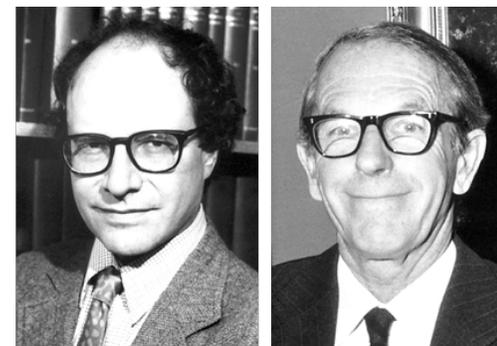
- Degradação química seletiva e sequencial de nucleotídeos – em desuso

- Sanger (1977)

- método enzimático, com terminação controlada da síntese de DNA com di-desoxinucleotídeos
- manual ou automatizado

- Metodologias de alto desempenho ou NGS (*Next Generation Sequencing*)

- Diferentes métodos, que vão sendo rapidamente substituídos por tecnologias mais eficientes e baratas

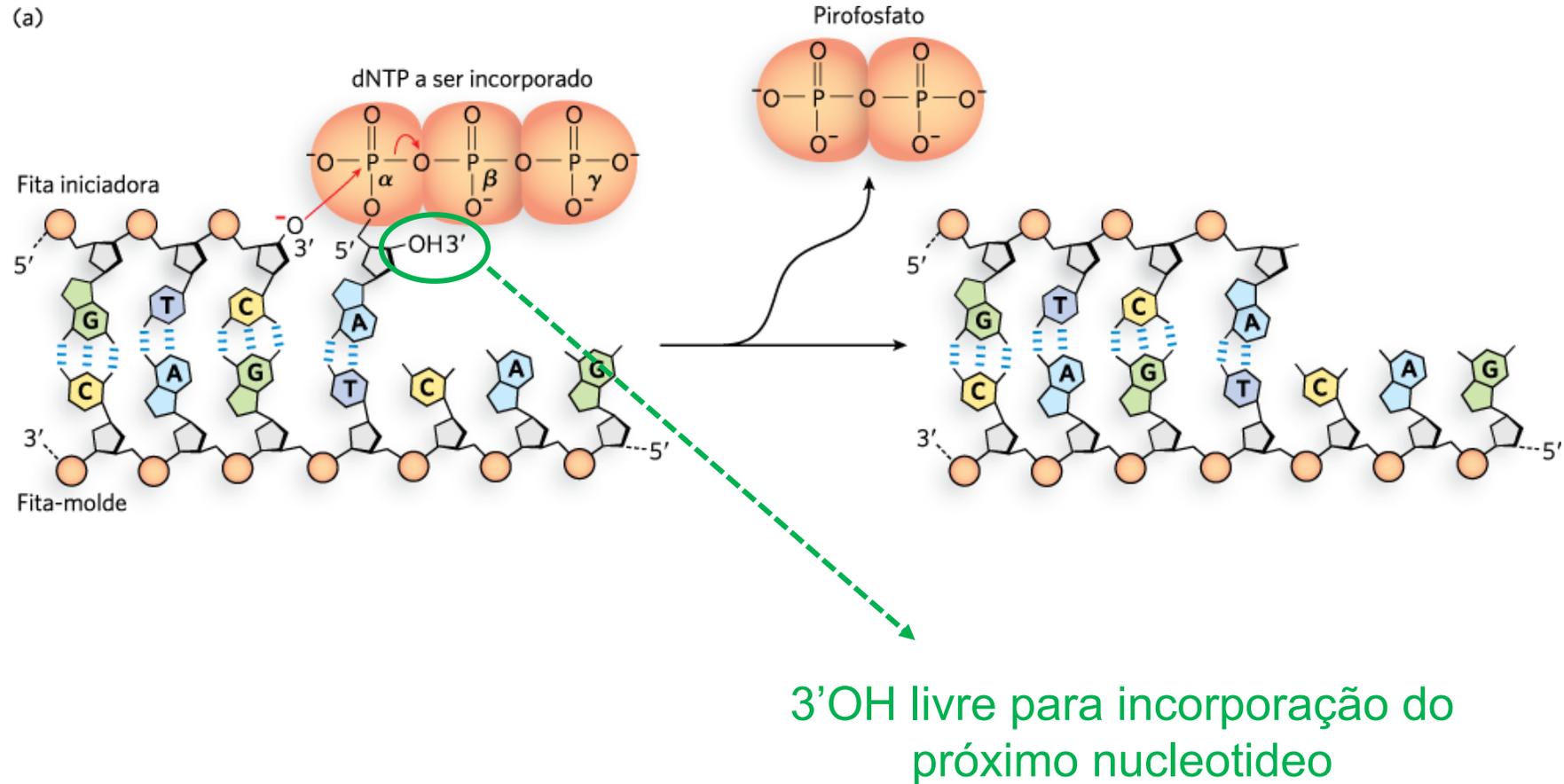


Walter Gilbert

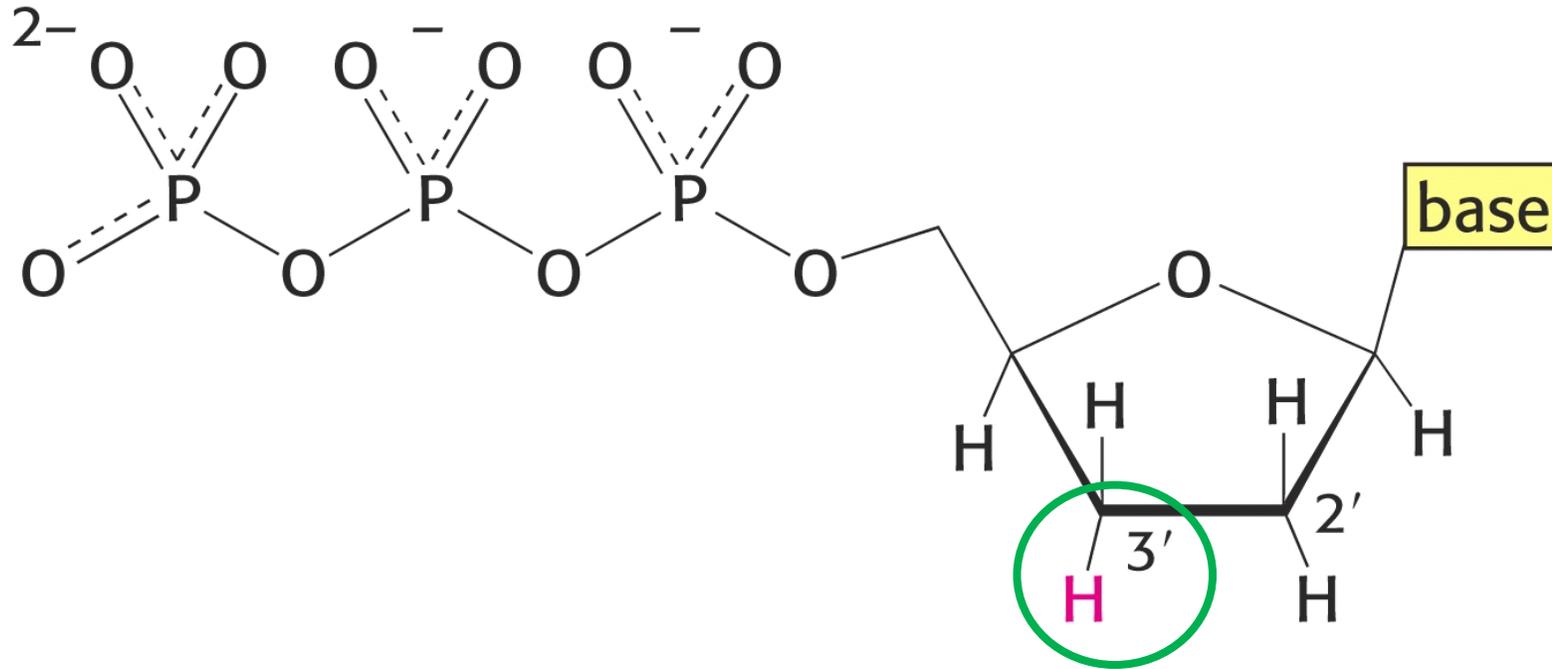
Frederick Sanger

1980: Prêmio Nobel em Química por suas contribuições para determinação de sequências de bases de ácidos nucleicos

Síntese de DNA: DNA polimerase e dNTPs



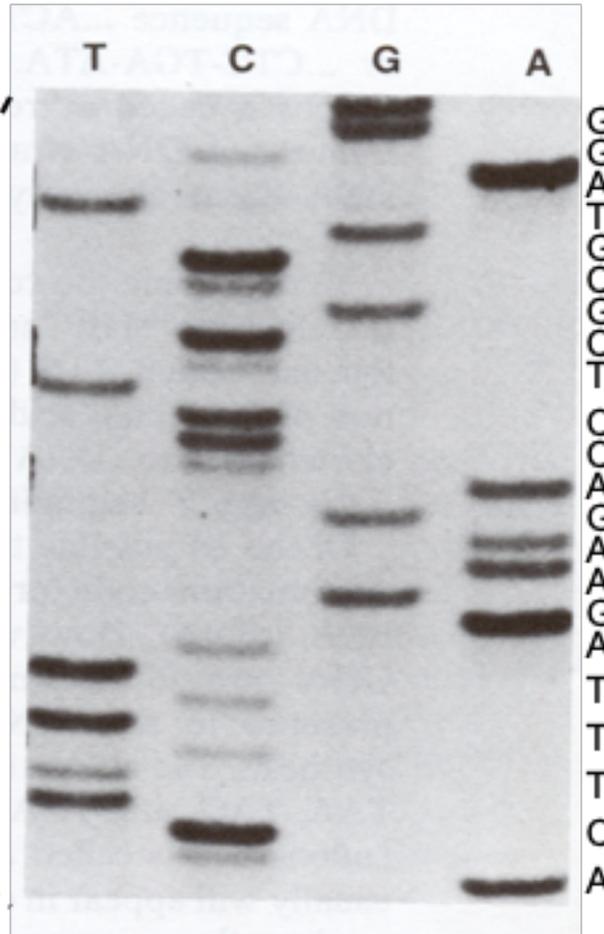
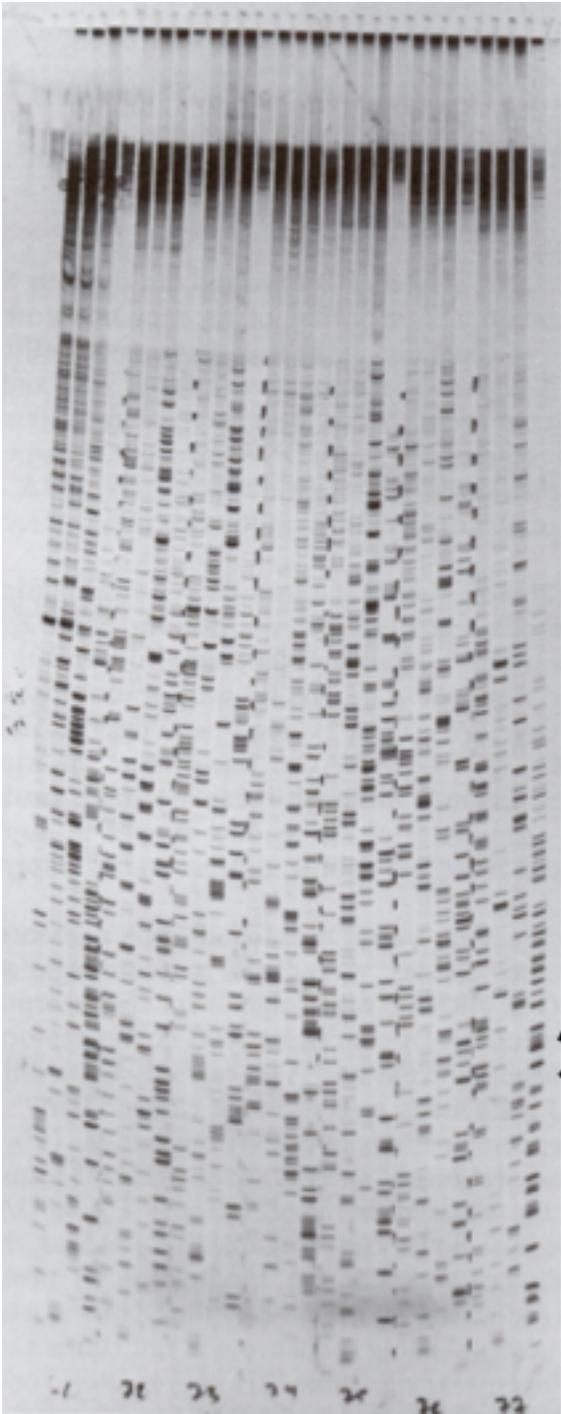
No sequenciamento de Sanger, são usados também ddNTPs nas reações



- 2',3'-dideoxirribonucleotídeo trifosfato (ddNTP)
- São adicionados em baixa concentração, em adição aos dNTPs
- Interrompem o crescimento da cadeia

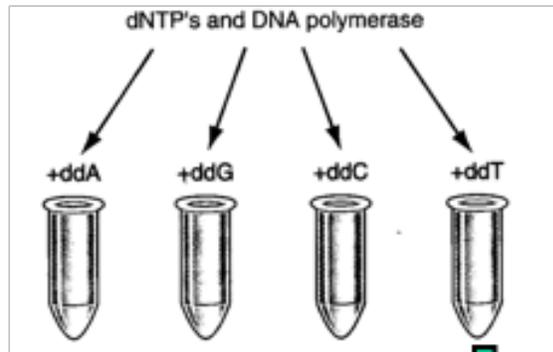
Autorradiograma de um gel de sequenciamento de DNA

Tamanho médio das
sequências:
200-300 bp



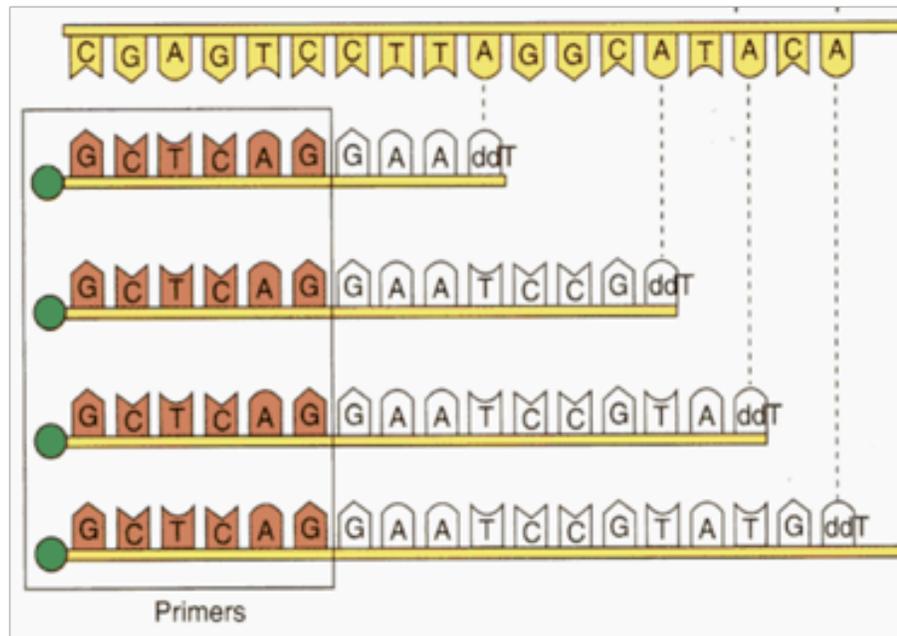
5' → 3'

Método de Sanger com primer radioativo



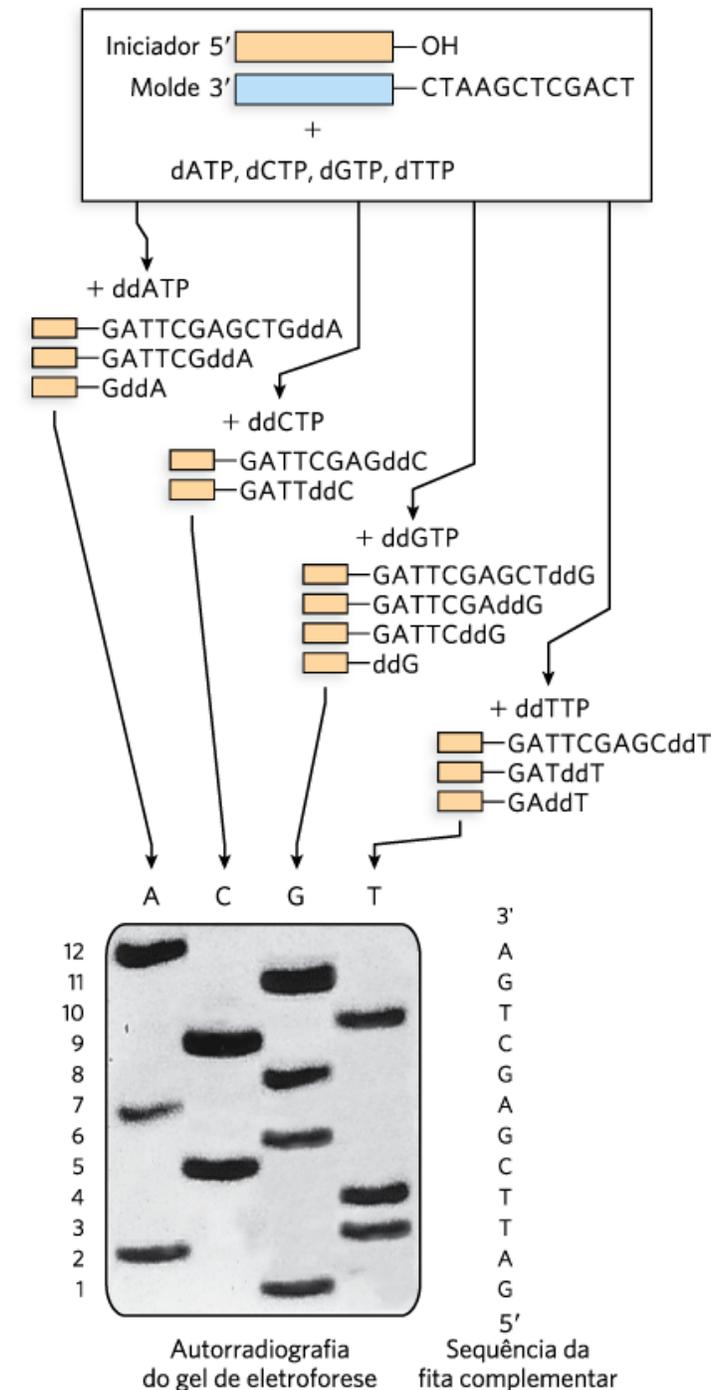
ddTTP

- 4 tubos separados, um em cada poço do gel
- Auto-radiografia
- Sequência complementar ao molde



Método de Sanger “clássico”

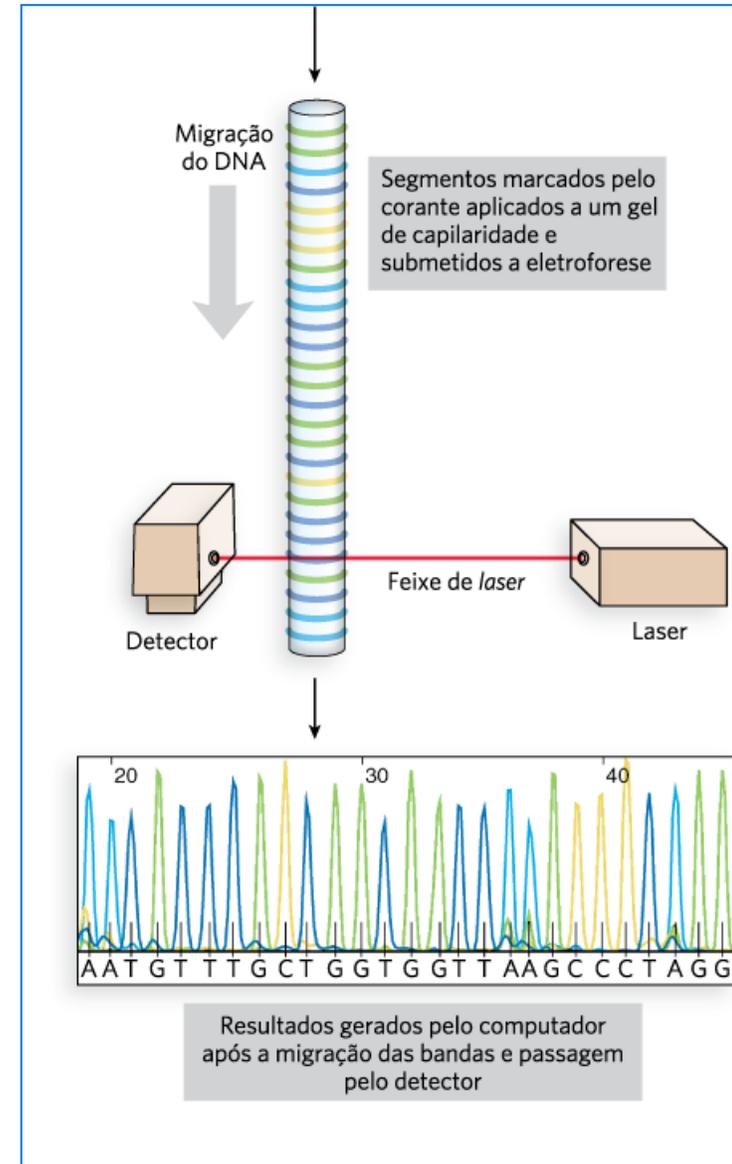
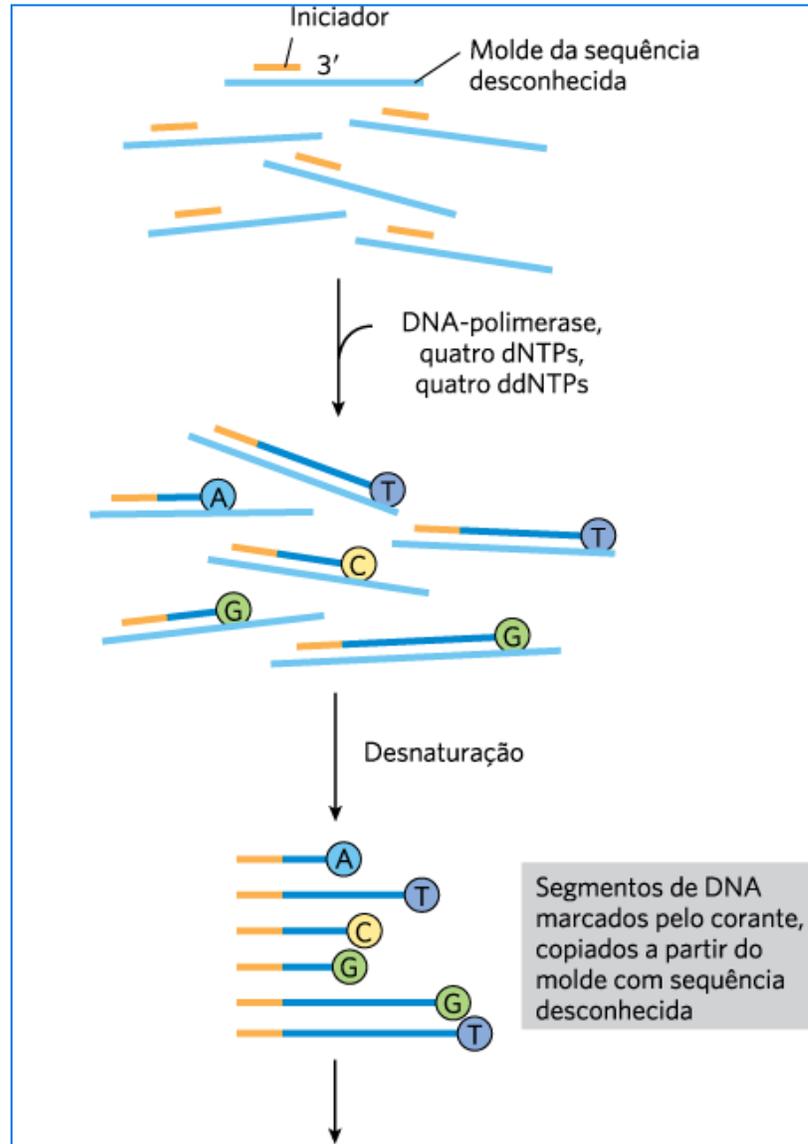
- 4 tubos, com apenas um dos ddNTPs em cada (ddATP, ddCTP, ddGTP e ddTTP), os 4 NTPs e um primer radioativo
- Parada da síntese pela incorporação dos ddNTPs
- Eletroforese, autorradiografia e leitura do filme pela altura das bandas



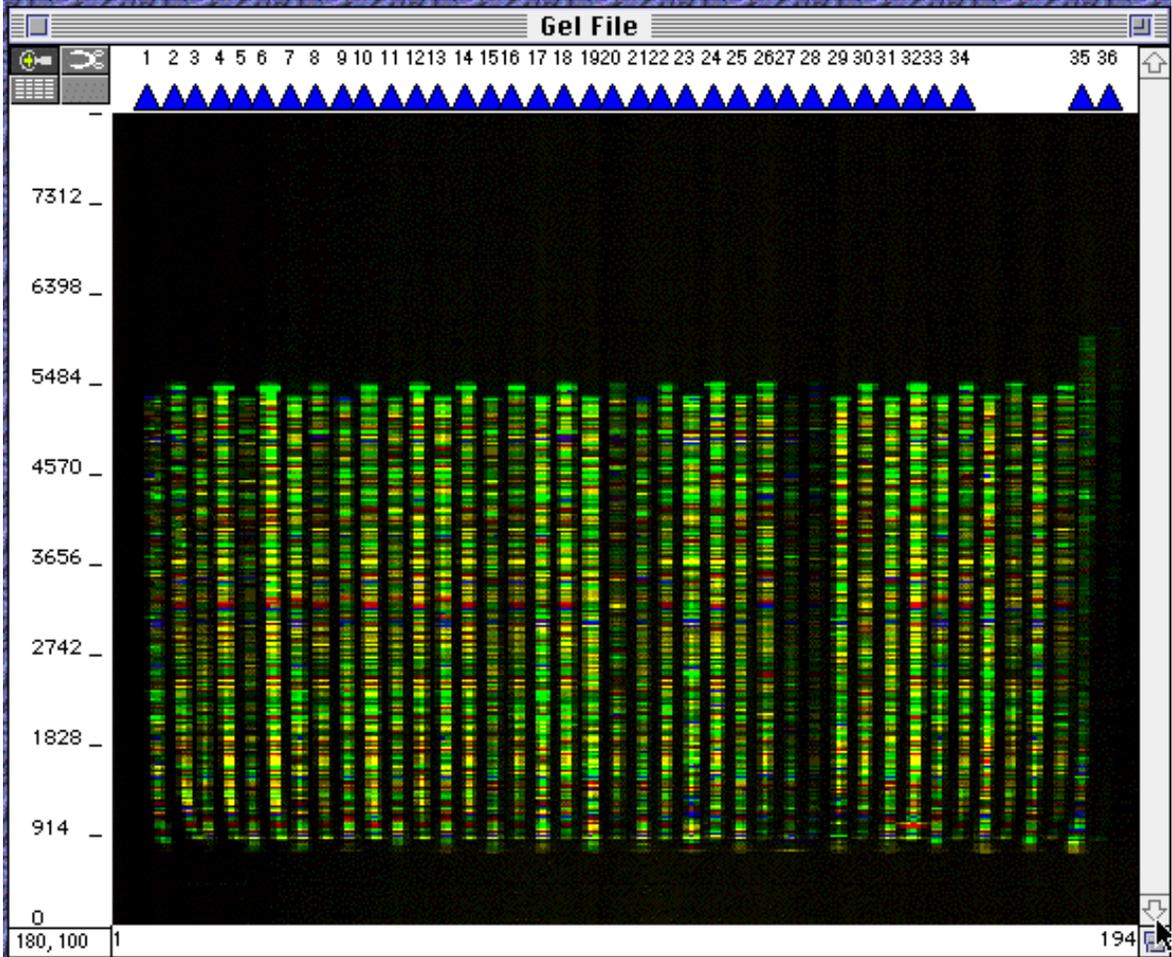
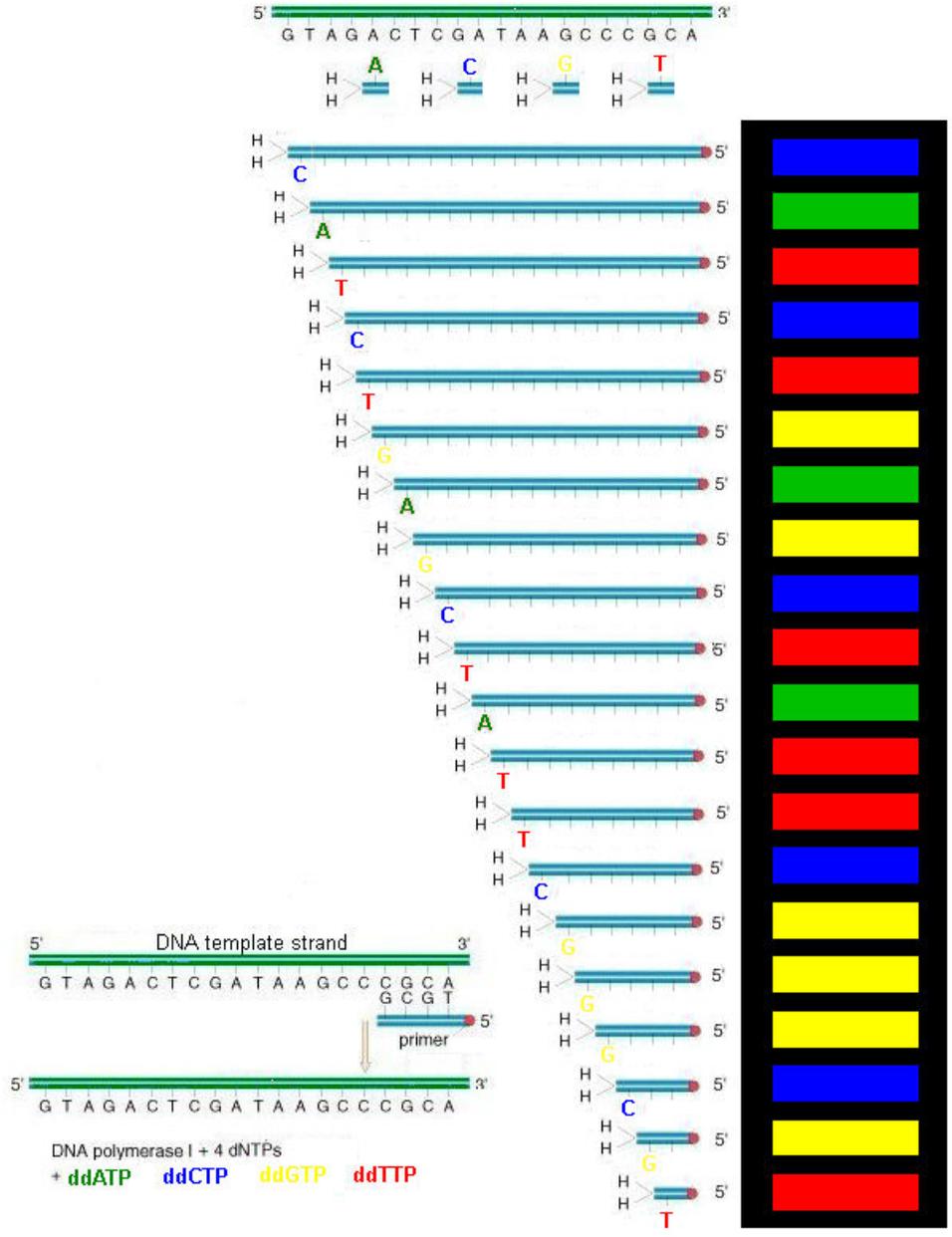
Desvantagens

- Necessidade de nucleotídeos marcados com ^{32}P (radiação beta com meia-vida de apenas 15 dias)
- Montagem dos géis finos (0.5 mm) de poliacrilamida era trabalhosa
- Necessidade de exposição em filmes de raio-X e revelação (prata como resíduo)
- Longo tempo para todas as etapas

Automatização do sequenciamento pelo método de Sanger



Sequenciamento automatizado por Sanger

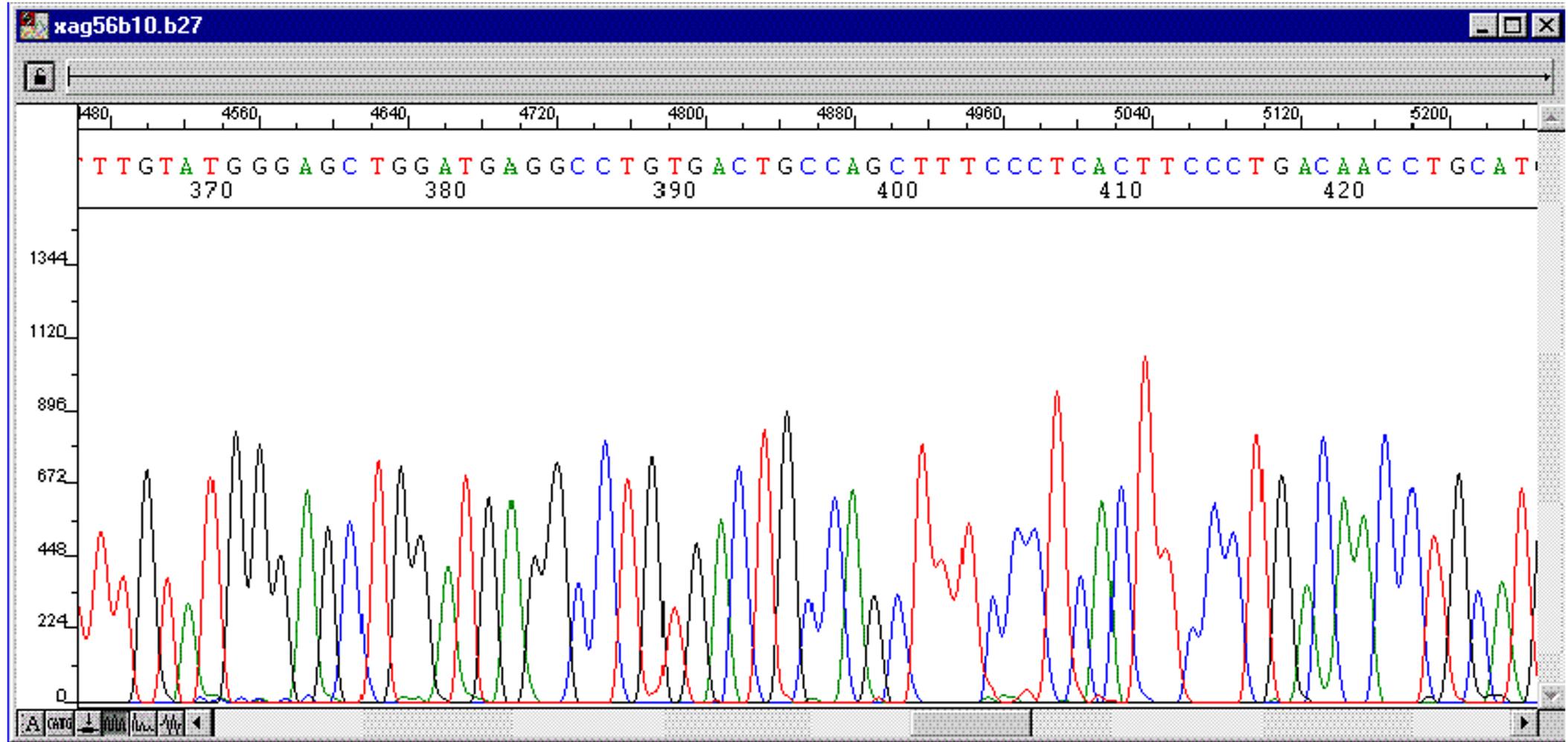


Automatização do método de Sanger

- Cada ddNTP é marcado com um corante fluorescente diferente
- A reação é feita em um único tubo com a mistura de dNTPs e ddNTPs
- Os produtos das reação são separados por eletroforese capilar (uma amostra/capilar)

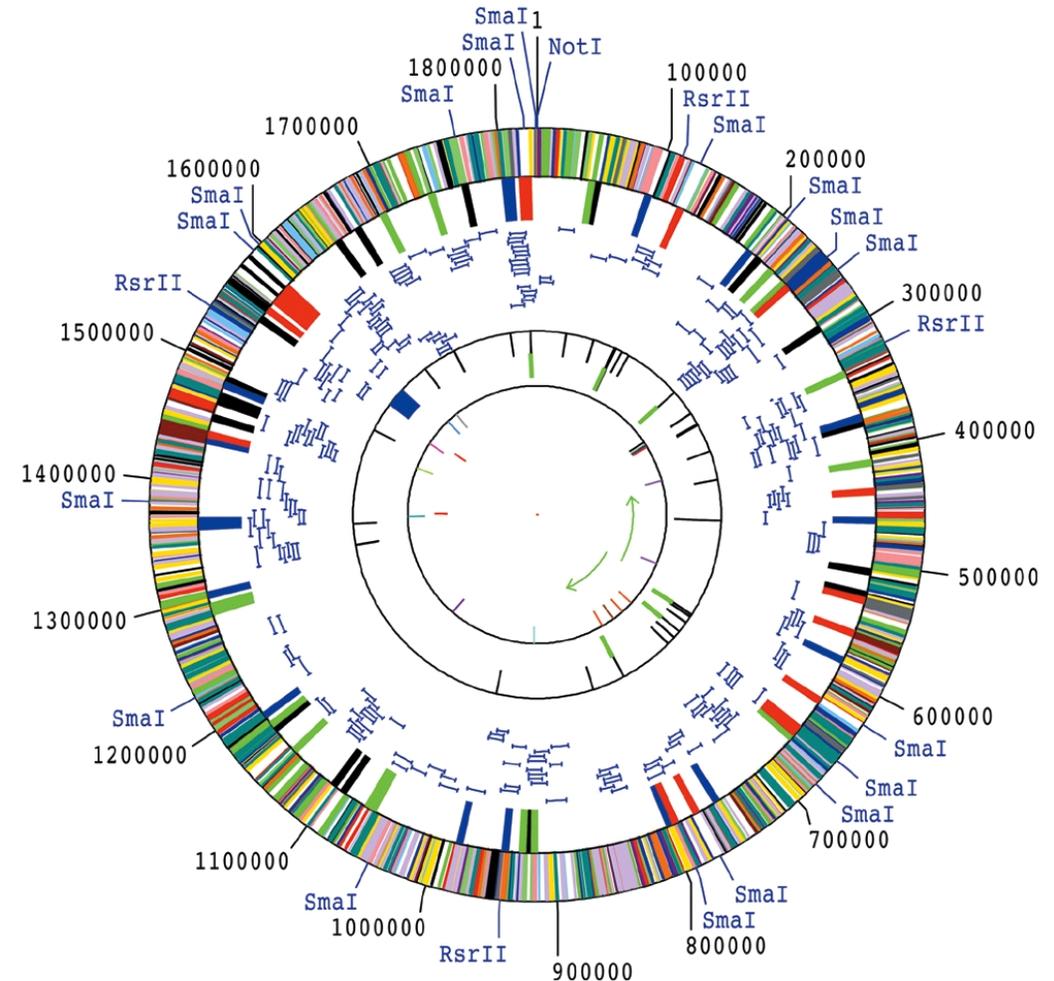
Cromatograma de um sequenciamento por Sanger

Tamanho médio das seqüências → 700-1000 bp

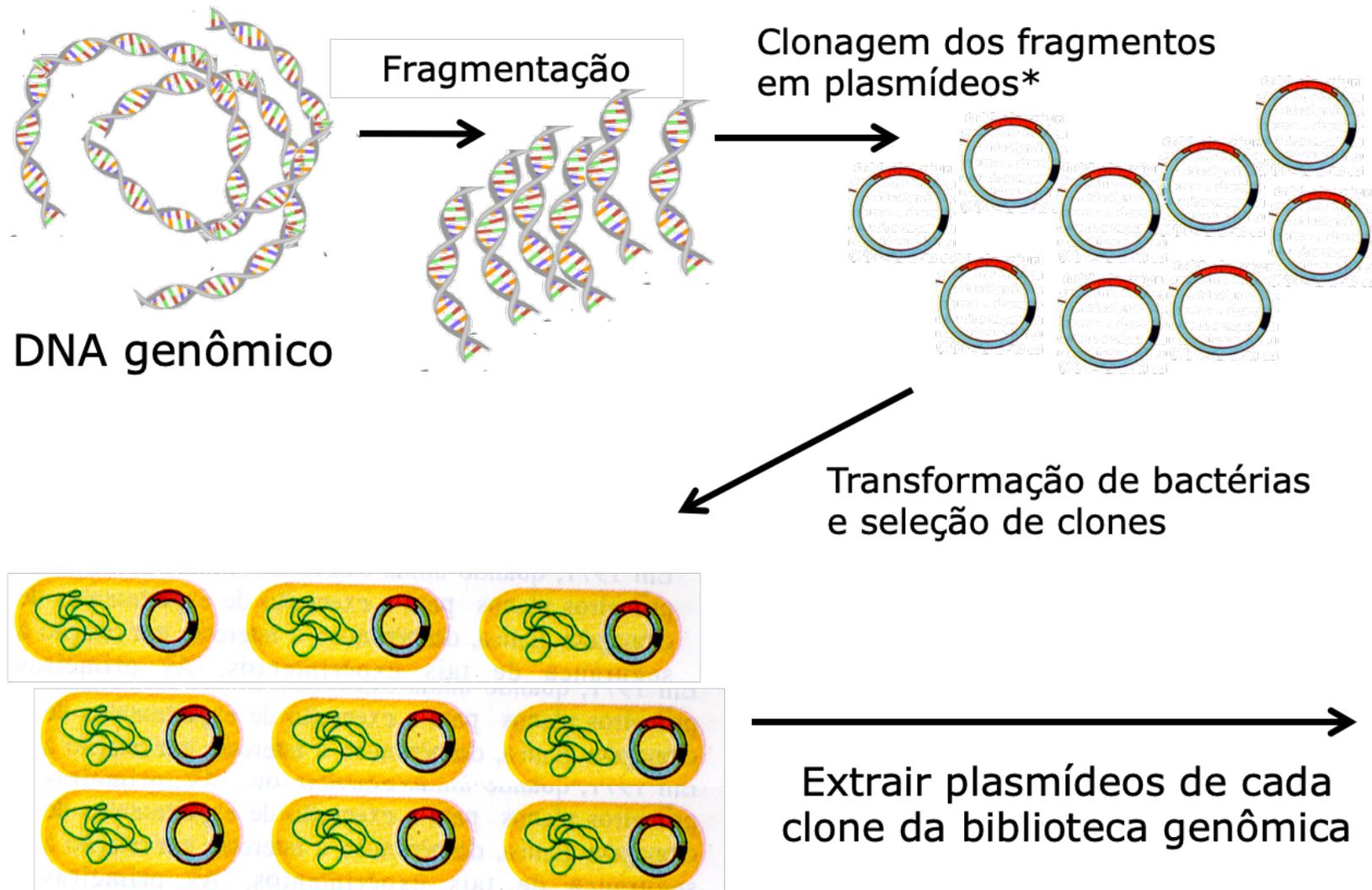


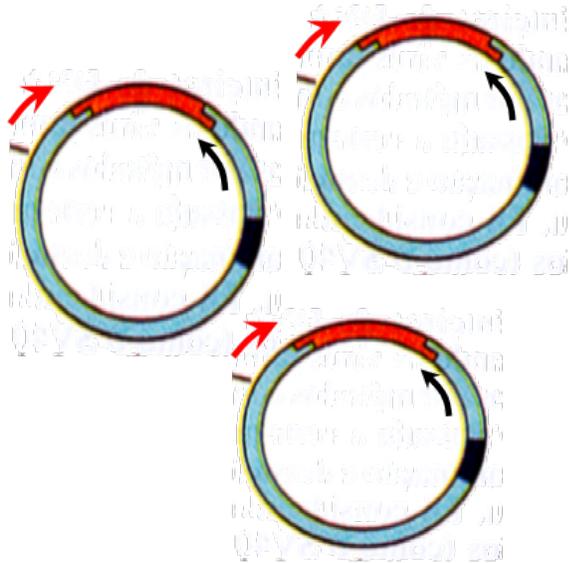
Primeiro genoma bacteriano a ser sequenciado - 1995

- *Haemophilus influenzae*
- 1.830.137 bp



Como os genomas eram sequenciados





Sequenciar os insertos de cada um dos clones plasmidiais pelo método de Sanger



```

    . . . ACCGTAATGGGCTGATCATGCTTAAA
    . . . ACCGTAATGGGCTGATCATGCTTAAA
    TGATCATGCTTAAACCCTGTGCATCCTACTG . . .
    TGATCATGCTTAAACCCTGTGCATCCTACTG . . .
  
```



Montagem das sequências de cada clone *in silico*

```

    . . . ACCGTAATGGGCTGATCATGCTTAAA
    TGATCATGCTTAAACCCTGTGCATCCTACTG . . .

    . . . ACCGTAATGGGCTGATCATGCTTAAACCCTGTGCATCCTACTG . . .
  
```



Contigs



Genoma completo

Sequenciamento de genomas pelo método de Sanger é laborioso e caro

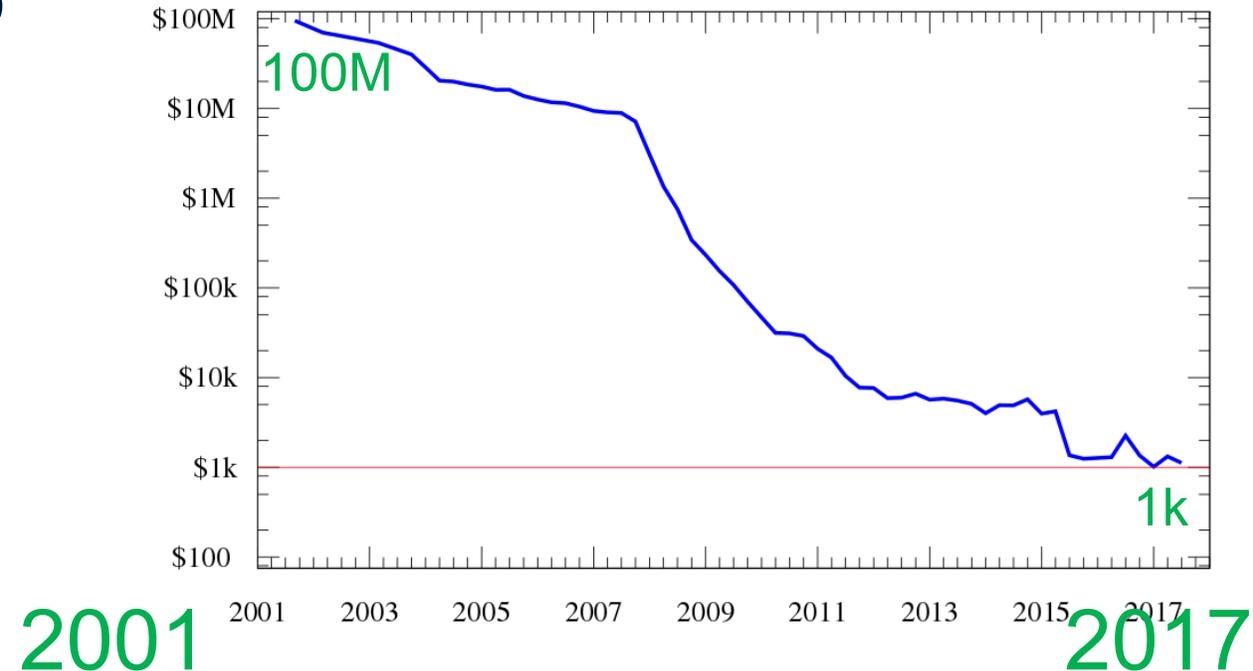
- requer

- reações separadas para cada fragmento de DNA a ser sequenciado
- clonagem dos fragmentos em vetores
- cultura das bactérias contendo cada fragmento

- Foi o método usado no sequenciamento do genoma humano (2001)

custo (USD)

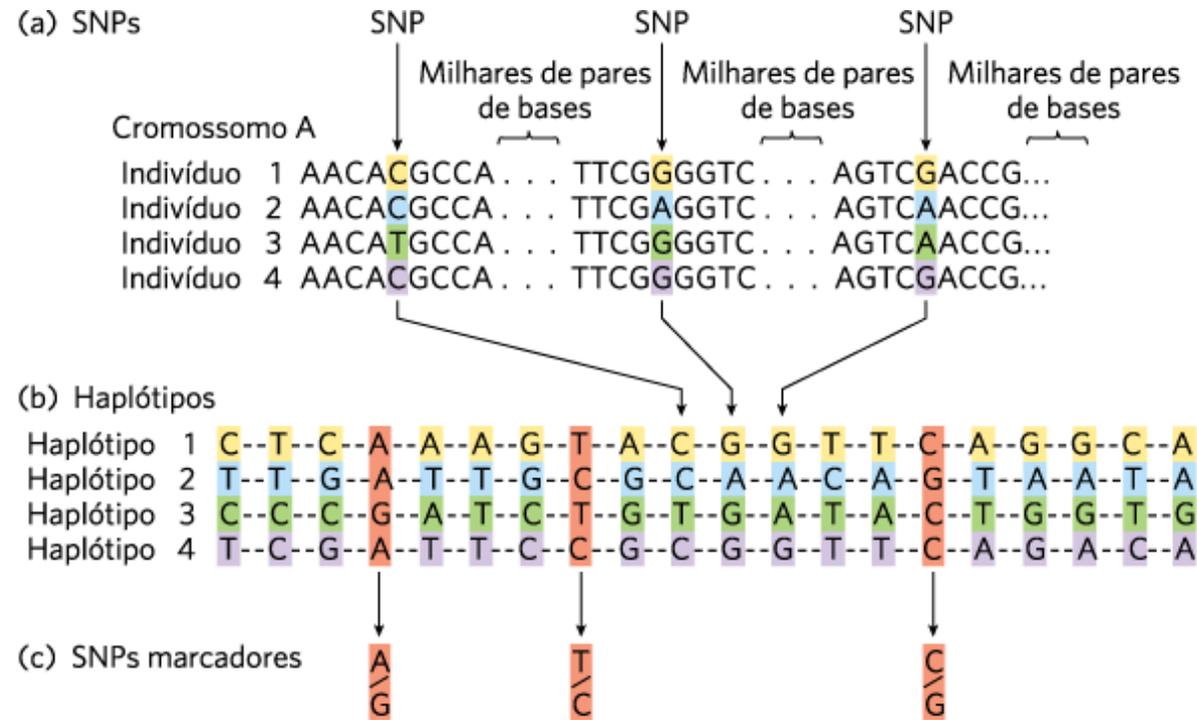
Cost to sequence a human genome (USD)



Aplicações do sequenciamento de DNA

- sequência de fragmentos de DNA (clonados em plasmídeos, produtos de PCR)
 - Diagnóstico, pesquisa, biotecnologia
 - Ainda é amplamente usado nesses casos
- Sequência completa de cromossomos e genomas
- Sequências de transcritos de RNA (via cDNA)

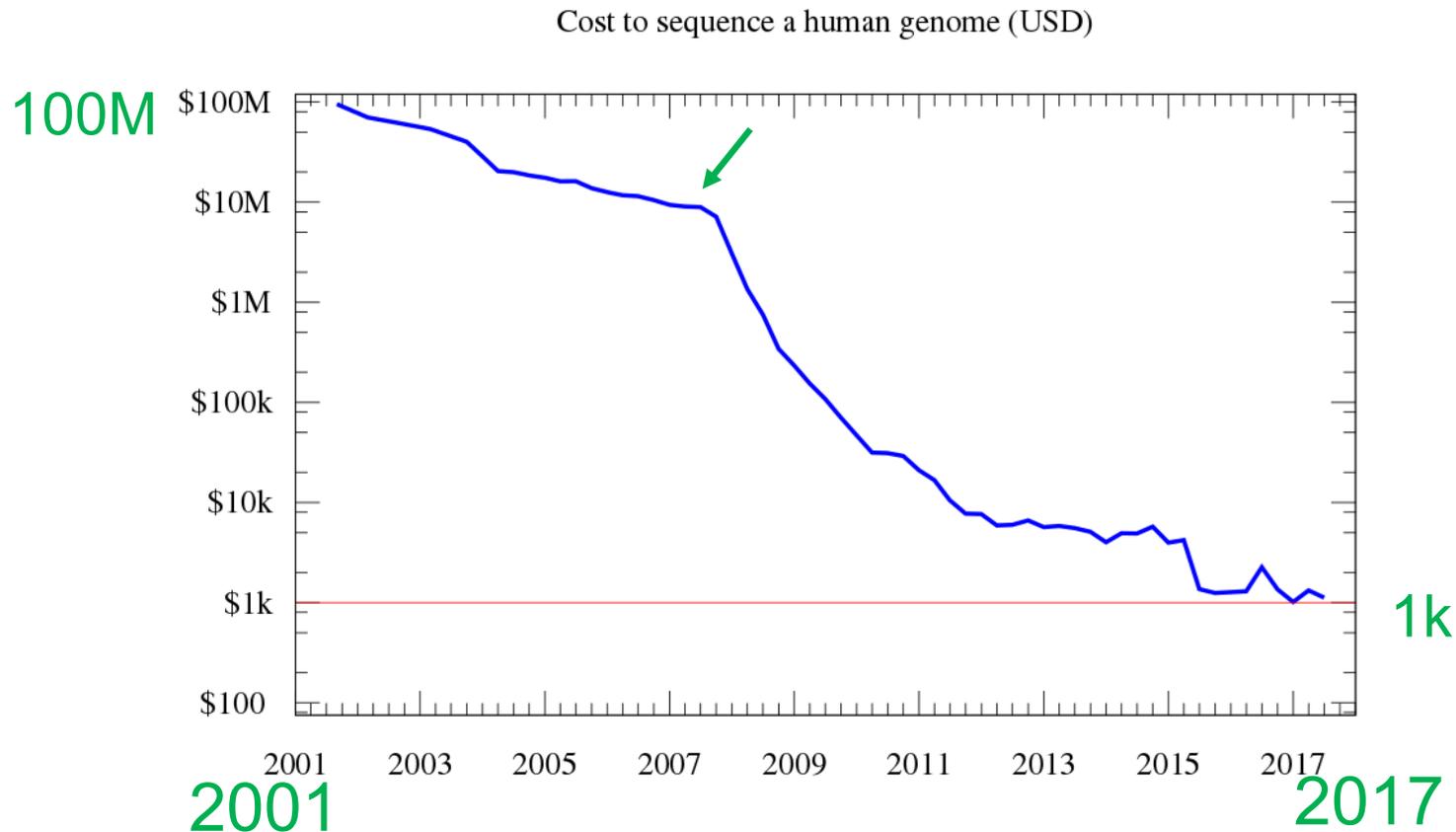
Sequenciamento e comparação de sequências genômicas de indivíduos



- Identificação de **SNP** (polimorfismo de único nucleotídeo) em genomas.
- Grupos de SNPs marcadores são compilados em um haplótipo e podem ser utilizados para identificação de indivíduos pelo sequenciamento de regiões definidas de seus genomas.

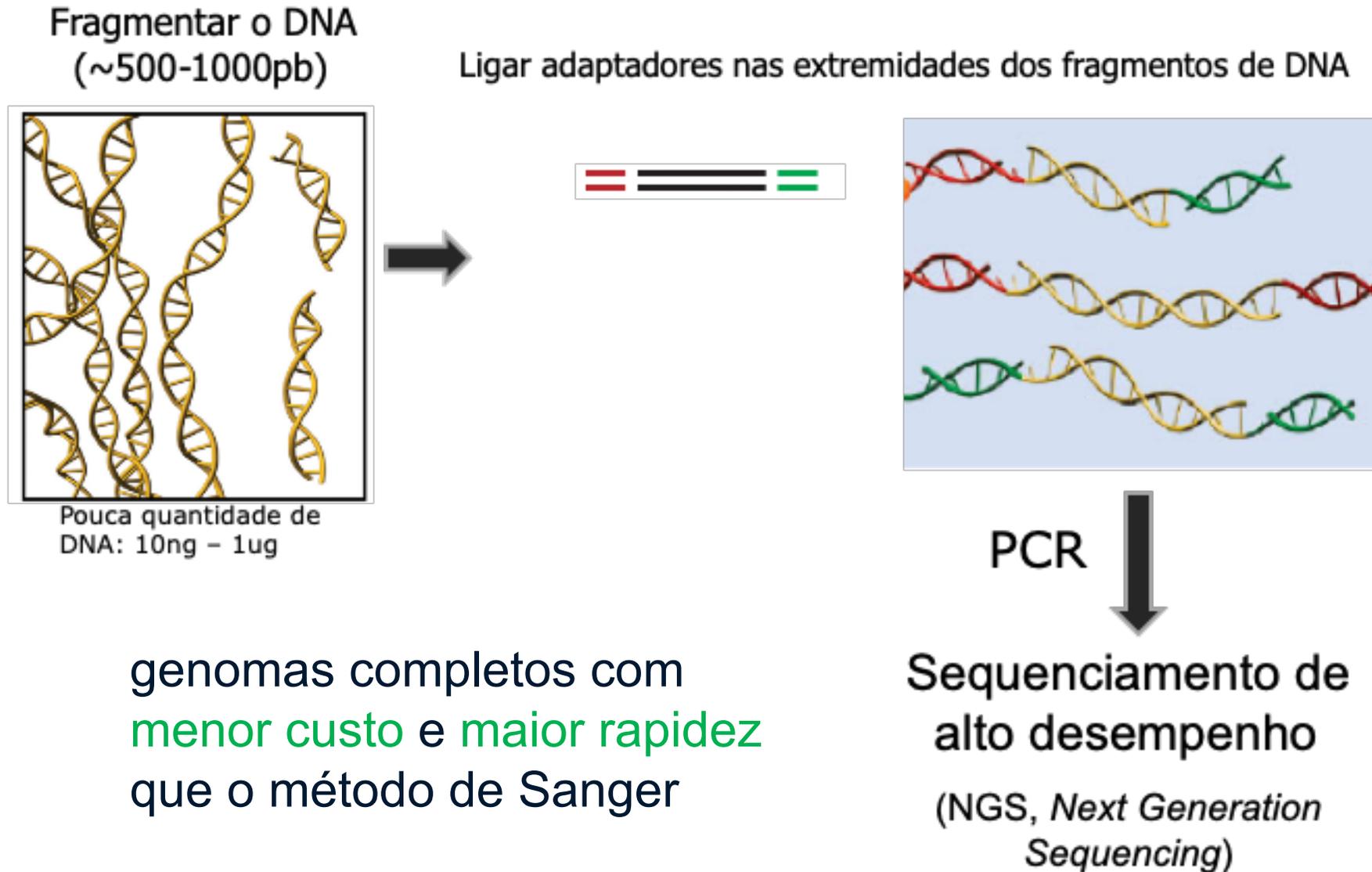
NGS – next generation sequencing

Custo para sequenciar um genoma humano (USD)

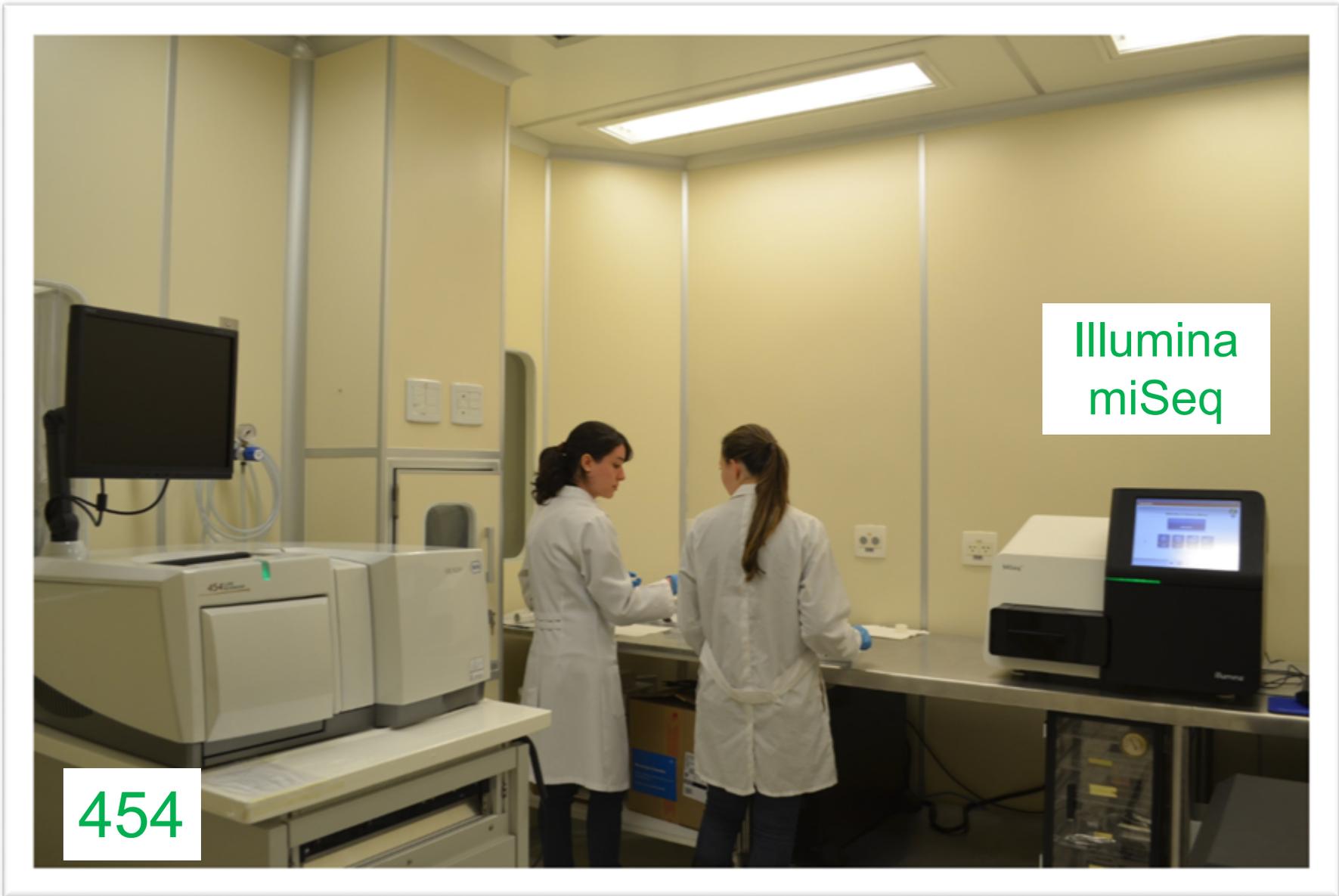


(cálculo feito pelo NHGRI/NIH, EUA)

Sequenciamento de DNA por metodologias NGS

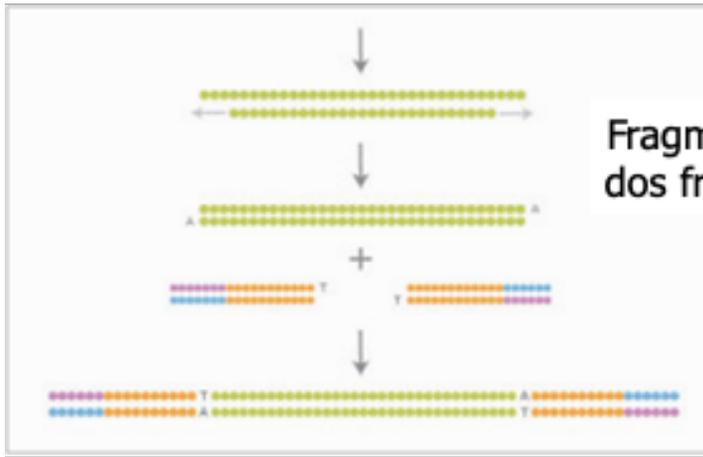


genomas completos com menor custo e maior rapidez que o método de Sanger



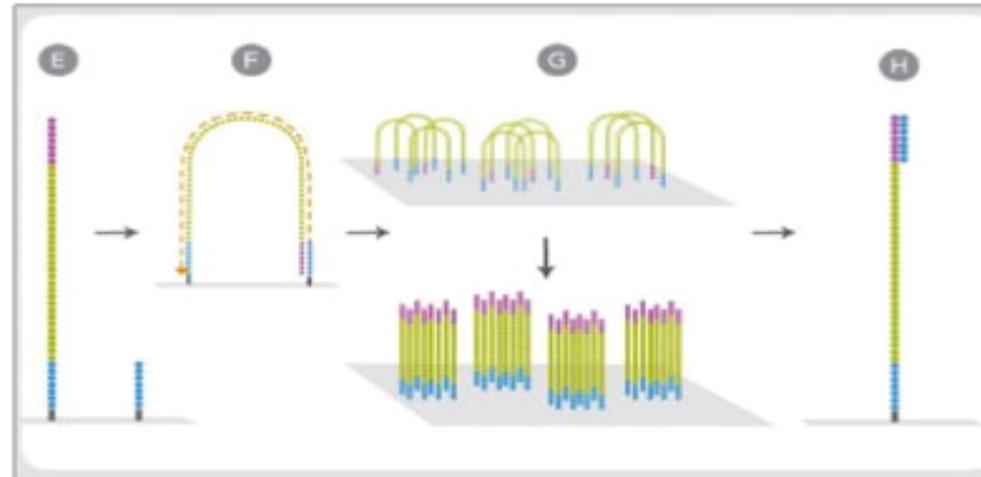
CATG – IQUSP (Bloco 11 inf)

Sequenciamento Illumina

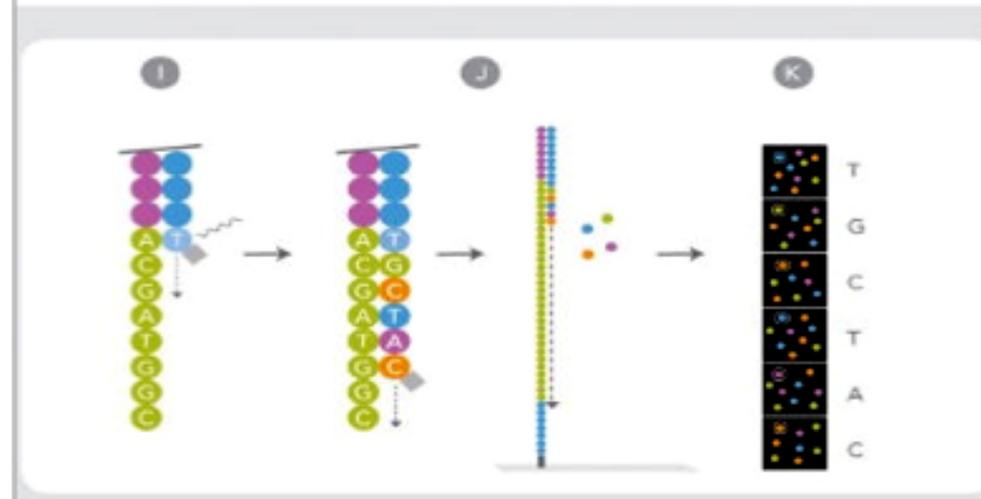


Fragmentar o DNA e ligar adaptadores extremidades dos fragmentos de DNA

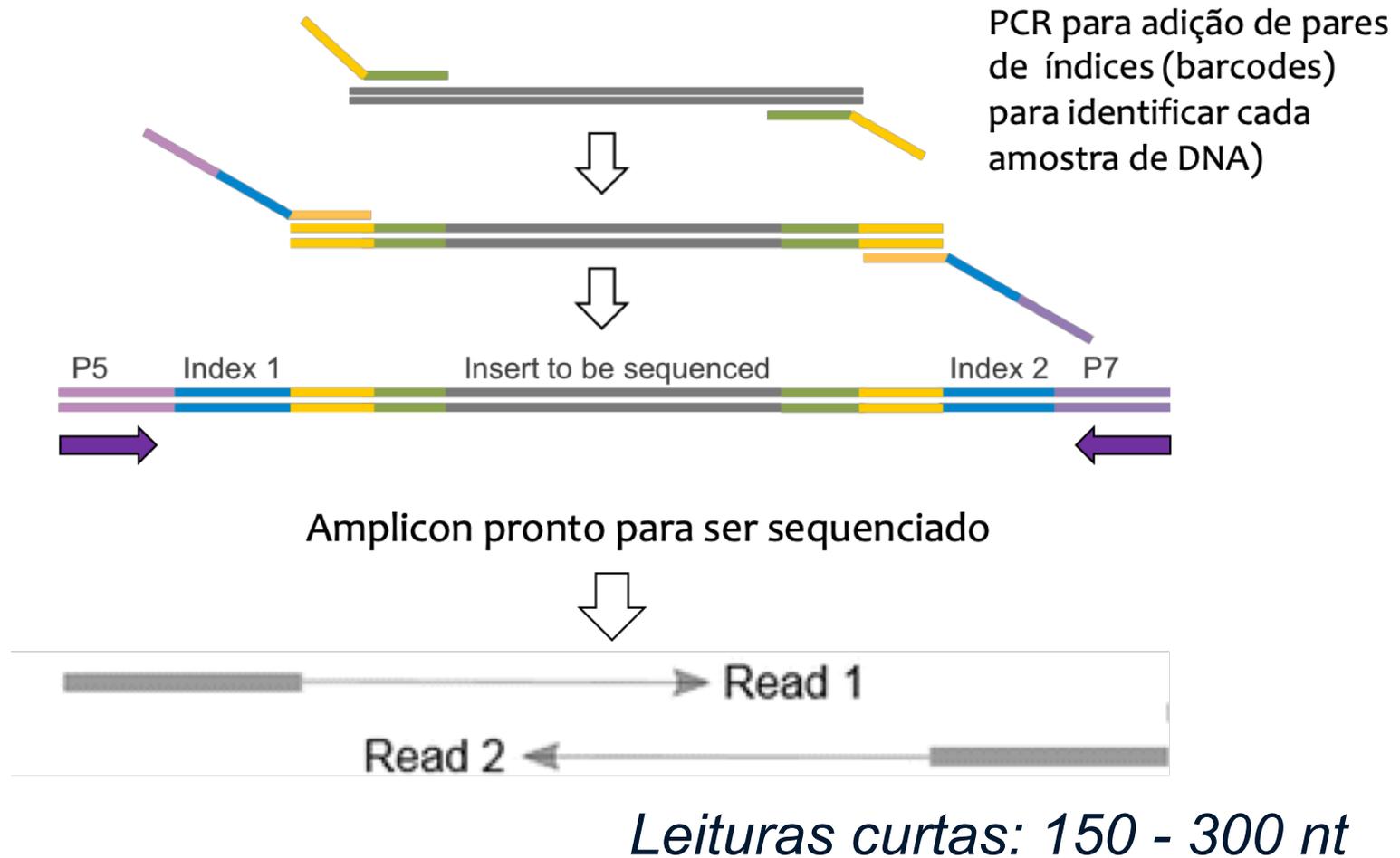
Amplificação dos fragmentos diretamente na célula de sequenciamento.



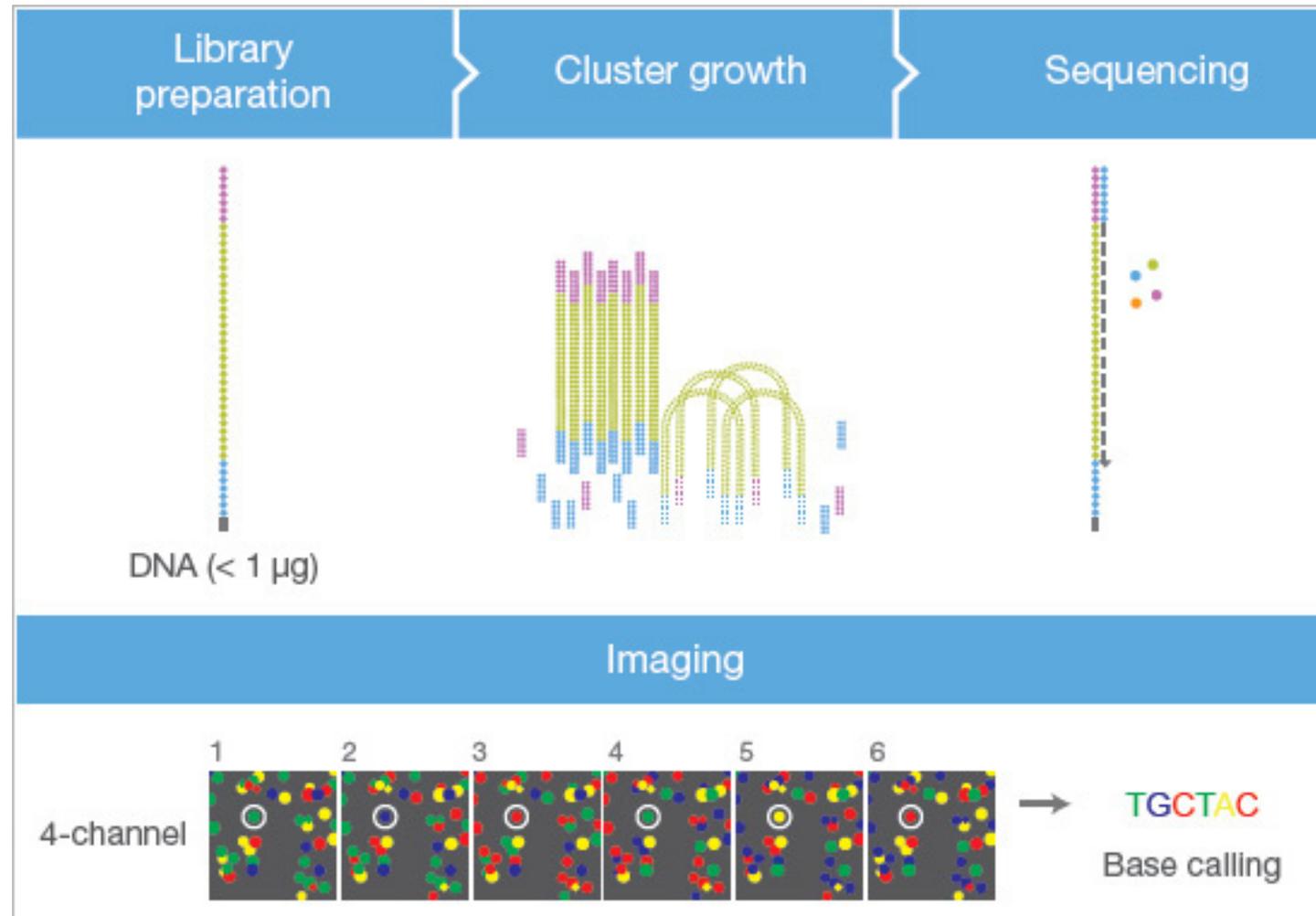
Sequenciamento por síntese. Incorporação de nucleotídeos fluorescentes bloqueados. O desbloqueio antecede o próximo ciclo.



Ilumina



Sequenciamento Illumina



Análise das fluorescências emitidas em cada ciclo permite determinar a sequência de DNA

Sequenciamento Illumina - video

<https://www.youtube.com/watch?v=fCd6B5HRaZ8>

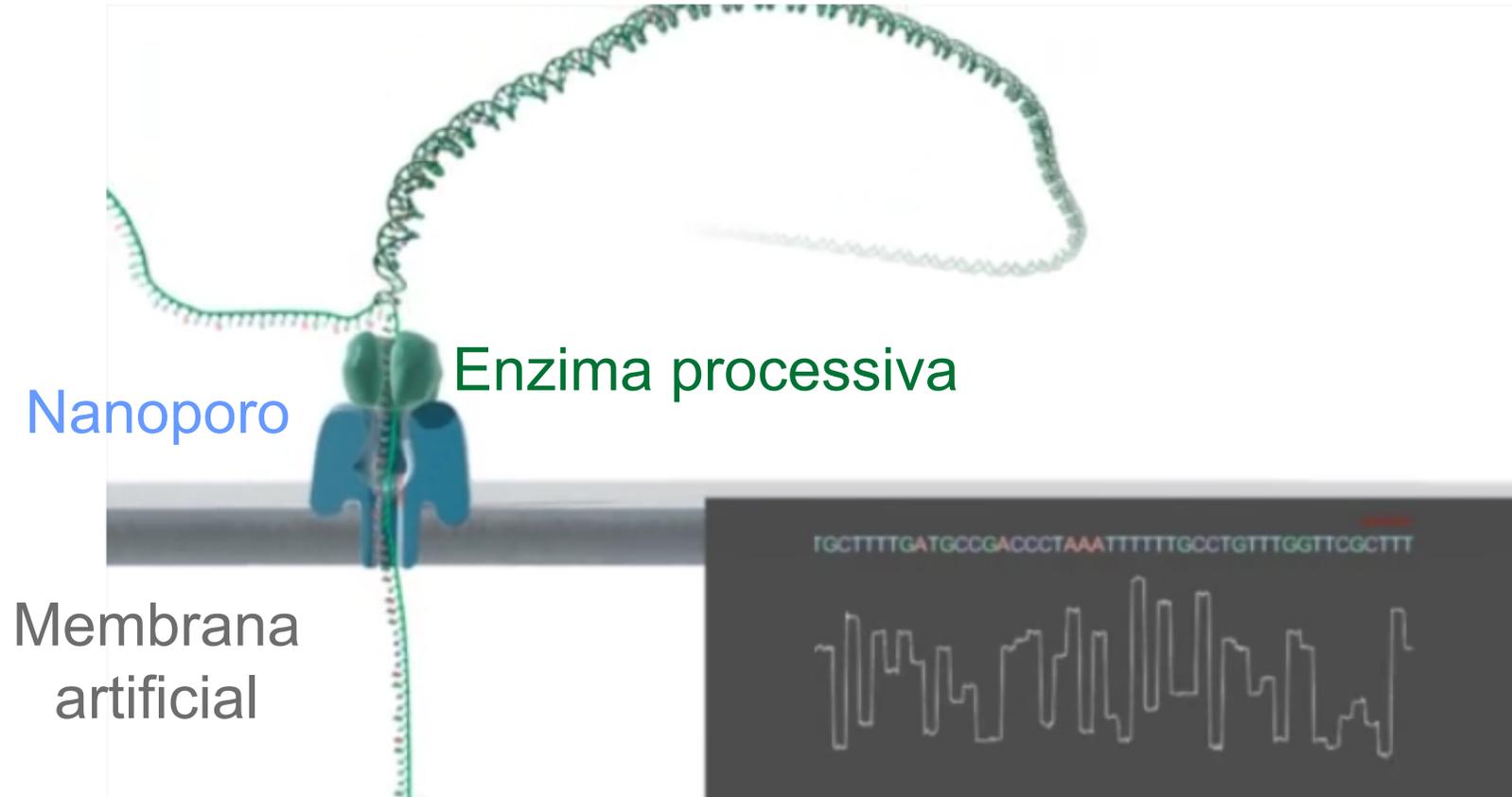
- Um dos métodos mais utilizados atualmente
- Cada nucleotídeo é marcado com um fluoróforo diferente
- Fluorescência detectada quando o nucleotídeo é incorporado
- Sistemas que “injetam” os reagentes em ordens determinadas (*fluidics*)

- Não usa ddNTP

Sequenciamento com leituras longas > 10.000 nt (*long reads*)

Pacific Biosciences (PacBio)	Síntese com DNA polimerase e detecção da fluorescência de dNTPs liberada na síntese	Não utiliza PCR. Sequenciamento direto de cada fragmento de DNA
MinION (Oxford Nanopore)	Leitura da sequência de DNA enquanto a fita atravessa um nanoporo proteico e causa mudança de condutância	Não utiliza PCR. Sequenciamento direto de cada fragmento de DNA

Nanopore sequencing (MinIon)



Condutância do canal muda a cada nucleotídeo que o atravessa

Minlon - video

<https://nanoporetech.com/how-it-works>

- DNA ligado a uma enzima que direciona uma fita simples para o canal
- Poro proteico numa membrana artificial que detecta a mudança de condutância do canal a cada nucleotídeo que o atravessa
- Detecção de dados em tempo real

Aplicações NGS - definições

- Genômica
 - Sequenciamento de todo o genoma
 - Exoma – sequenciamento dos exons, a partir do mRNA
- Transcritômica
 - Sequenciamento de todos os RNAs presentes numa determinada condição
- Metagenômica
 - Sequenciamento de todo o DNA de amostras ambientais, sem isolar os microrganismos presentes

Ótimos temas para o trabalho!

Aplicações NGS - exemplos

- Genômica
 - estudos de evolução
 - Diagnóstico de doenças genéticas
- Transcritômica
 - estudos de expressão gênica
 - marcadores para câncer e outras doenças
- Metagenômica
 - relação entre microbioma e saúde
 - estudos ambientais: descoberta de novos genes/enzimas; ecologia e evolução

Ótimos temas para o trabalho!

Avaliação da disciplina

- Por favor, deixem seus comentários, críticas e sugestões no e-disciplinas, ou mandem por email!
 - aulas teóricas
 - atividades
 - tempo dedicado à disciplina
 - métodos de avaliação
- É muito importante para planejar novas atividades e disciplinas não-presenciais e compartilhar a experiência com outros docentes

Críticas e sugestões

Usem esse espaço para ajudar com o andamento da disciplina. Comentem sobre o que estão gostando ou não, o que acham das aulas, atividades e avaliações. Obrigada!

Agradecimentos

- Luciana
- Ana Maria
- Ariosvaldo

- Família Baldini-Coelho: Alice, Daniel e Guilherme

- A todos os alunos, especialmente aos que assistem as aulas e participam!