Sekwencjonowanie metodą enzymatyczną Sangera zwaną dideoksy

Metoda ta polega na enzymatycznej replikacji jednoniciowej (zdenaturowanej) matrycy DNA. Proces ten rozpoczyna się od przyłączenia odcinka starterowego dla polimerazy, a kończy się wbudowaniem znakowanego fluorescencyjnie **dideoksynukleotydu** (ddNTP). ddNTP jest zmodyfikowanym nukleotydem, który przy 3 węglu pentozy zamiast grupy hydroksylowej (występującej w każdym deoksynukleotydzie) posiada wodór. Grupa hydroksylowa jest niezbędna do utworzenia wiązania fosfodiestrowego podczas syntezy DNA. Przyłączenie ddNTP do syntetyzowanego łańcucha przerywa syntezę DNA. Reakcję sekwencjonowania prowadzi się w 4 oddzielnych probówkach, które zawierają tę samą matrycę DNA oraz wszystkie składniki reakcji PCR (polimeraza DNA, dNTP, odcinek starterowy). Dodatkowo w każdej probówce znajduje się inny dideoksynukleotyd (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP). Podczas syntezy polimeraza DNA nie odróżnia deoksynukleotytu od dideoksynykleotydu, dlatego to, który z nich zostanie przyłączony jest całkowicie przypadkowe. Jeżeli podczas reakcji przyłączy się deoksynukleotyd, polimeraza dalej prowadzi syntezę, jeżeli przyłączony zostanie ddNTP dalsza synteza łańcucha zostaje przerwana. Po zakończonej reakcji, w każdej probówce znajdują się nowe fragmenty DNA różniące się długością, ale zakończone tym samym nukleotydem (w probówce z ddATP wszystkie fragmenty będą zakończone A, w probówce z ddCTP wszystkie będą zakończone C itd.) Zdenaturowane produkty rozdziela się elektroforetycznie (ryc. 6.16) w 4 oddzielnych ścieżkach żelu poliakryloamidowego. Automatyczny odczyt sekwencji DNA polega na detekcji światła emitowanego przez fluorochrom obecnego w ddNTP.

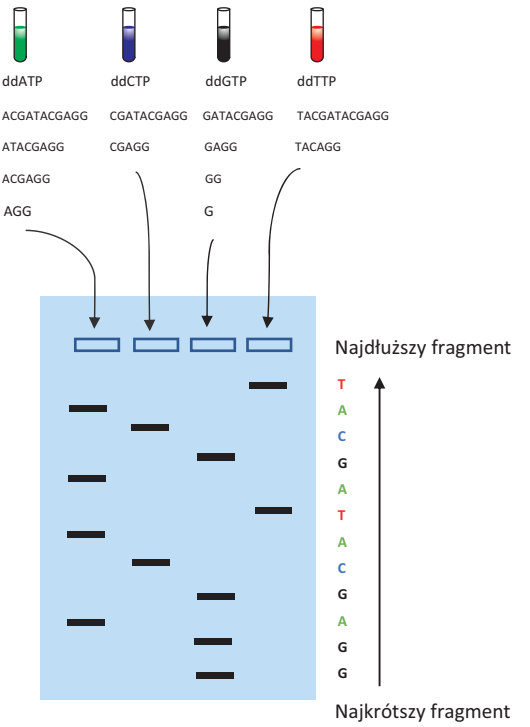
Pirosekwencjonowanie

Jest metodą sekwencjonowania DNA w czasie rzeczywistym. Przeprowadza się je w odpowiednim sekwenatorze. W metodzie tej wykorzystuje się jednoczesne działanie 4 enzymów – polimerazy DNA, sulfurylazy, lucyferazy i aspirazy. Główną zasadą tej techniki jest wykorzystanie pirofosforanu uwalnianego podczas syntezy DNA. W czasie reakcji dochodzi do emisji światła, którego intensywność zależy od ilości uwalnianego pirofosforanu, a tym samym liczby wbudowanych nukleotydów. Analiza zachodzi w ciągu kilkunastu minut, a w jednej reakcji możliwa jest jednoczesna analiza kilku polimorfizmów (lub mutacji) położonych blisko siebie.

Pirosekwencjonowanie wykorzystuje się najczęściej do genotypowania poznanych polimorfizmów.

6.7.8. Techniki wysokoprzepustowe

Metoda Sangera, chociaż powszechnie używana, ma istotne ograniczenie, a mianowicie ma niską przepustowość. Rosnące zapotrzebowanie na analizę sekwencji DNA



Ryc. 6.16. Sekwencjonowanie. Analizowane próby są poddane reakcji PCR z dideoksynukleotydami. Po zakończeniu reakcji, próby nakładane są na żel poliakryloamidowy, w którym dochodzi do rozdziału fragmentów DNA. Sekwenator odczytuje dideoksynukleotyd, który został wbudowany jako ostatni nukleotyd w DNA. Najwolniej migruje najdłuższy fragment DNA, w którym ostatnim nukleotydem jest T (ostatni w sekwencji). Kolejny fragment DNA na żelu jest o jeden nukleotyd krótszy (bez T), a sekwenator odczytuje ostatni w nim wbudowany nukleotyd (A). Tworzy się sekwencja TA. Następny fragment DNA będzie krótszy o kolejny nukleotyd, a ostatnim wbudowanym w nim ddNTP jest C (TAC) itd.

doprowadziło do opracowania kilku wysokoprzepustowych technologii określanych wspólnym terminem: **sekwencjonowanie nowej generacji (NGS**, ang. *next generation sequencing*). Obecnie coraz częściej nazywa się je także, masowe równoległe sekwencjonowanie (**MPS**, ang. *massively parallel sequencing*).

Sekwencjonowanie nowej generacji daje możliwość odczytu jednocześnie milionów fragmentów DNA, dlatego technologie takie nazywane są technikami wysokoprzepustowymi. Zaletami tej technologii, w porównaniu z tradycyjnymi technikami sekwencjonowania są: wzrost wydajności, krótki czas trwania, duża przepustowość, redukcja kosztów oraz wysoka precyzja. Do wykonania NGS wykorzystuje się komercyjne platformy jak np. Illumina, Roche454, SOLiD, IonTorrent, Pacific Biosciences, LiFe Technologies, Oxford Nanopore Technologies czy BGI/MGI. Producenci zapewniają