



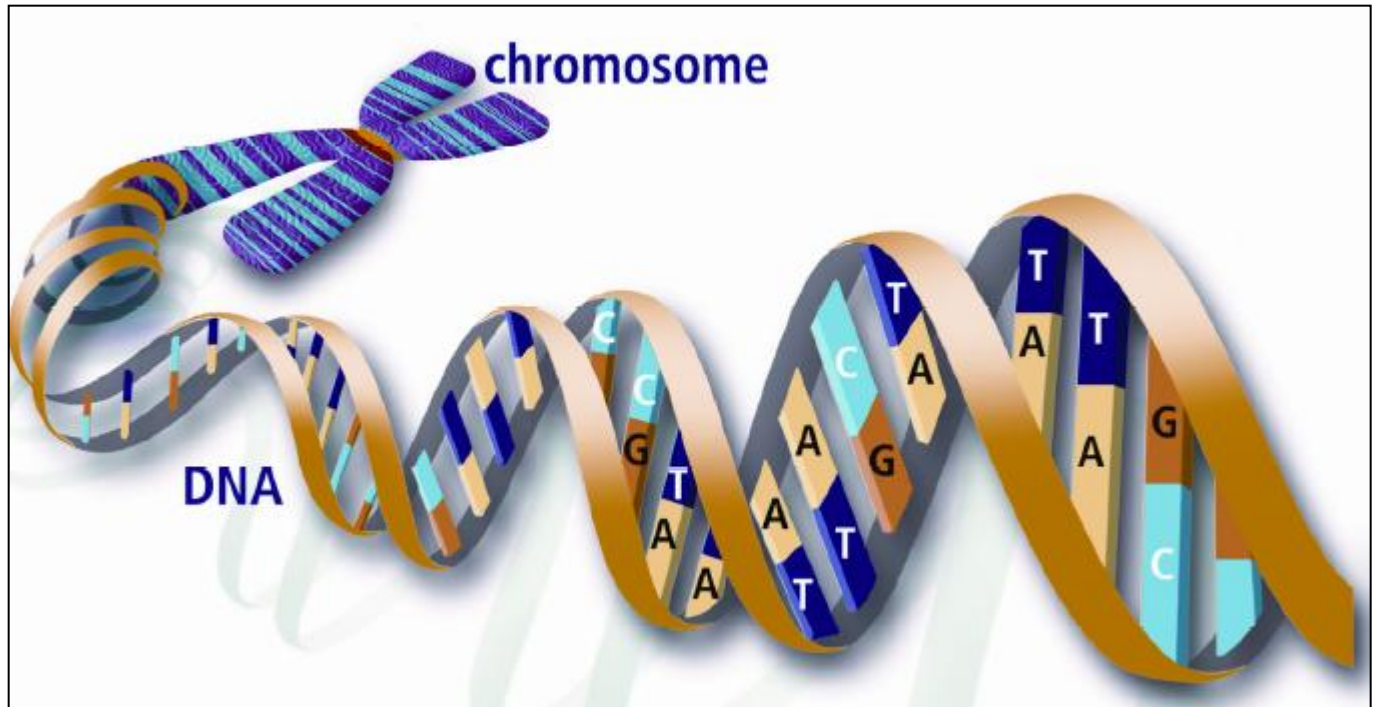
Sequenciamento de DNA

PROFa. ILÍADA RAINHA DE SOUZA

Colaboração do Lab. de Polimorfismos Genéticos

Conceito

- Determinação da seqüência de nucleotídeos





Década de 70



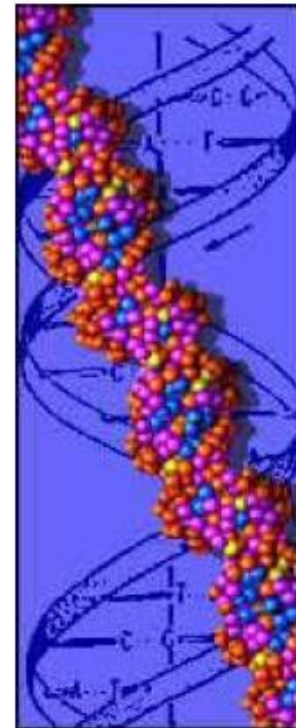
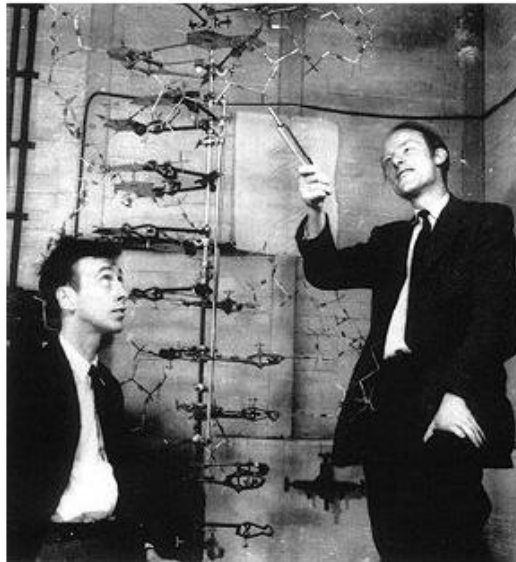


Histórico

- **Desenvolvido em 1977, por Frederick Sanger**
- 24 anos entre a descoberta da dupla hélice e o método de seqüenciamento do DNA

Nobel de
Química
1980 !

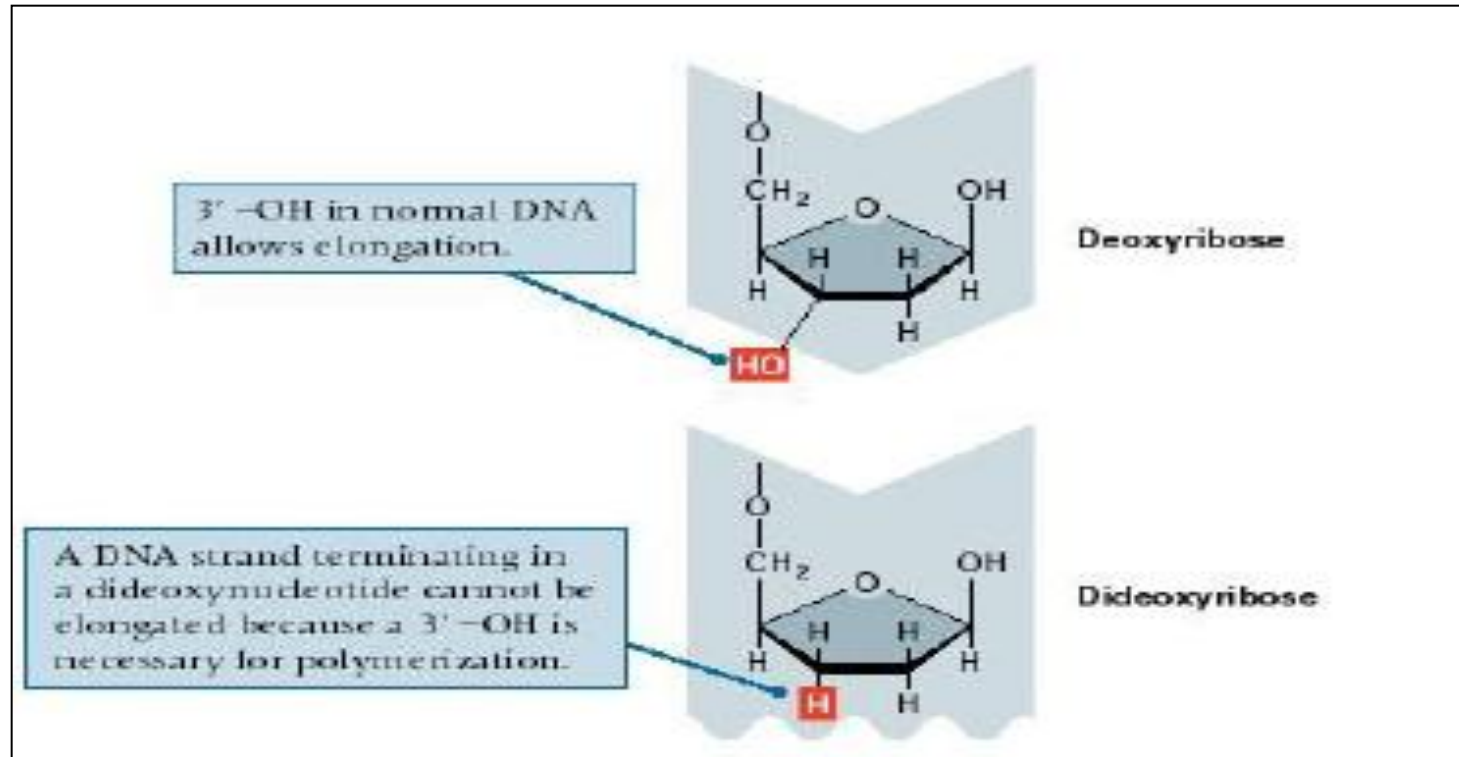
1953 - Watson e Crick



Modelo dupla hélice do DNA

MÉTODOS CLÁSSICOS

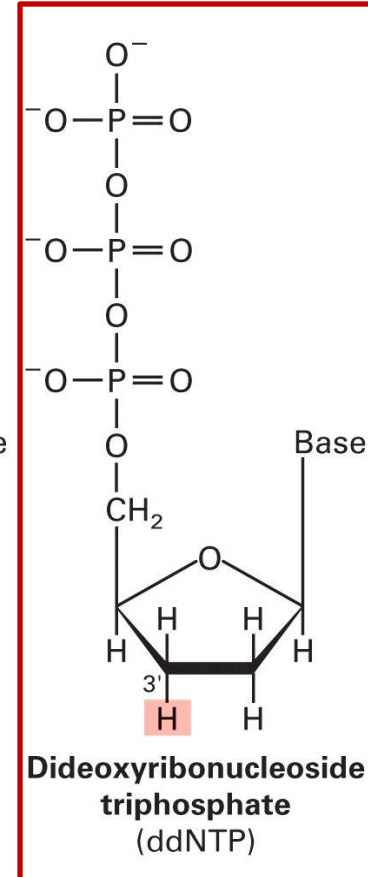
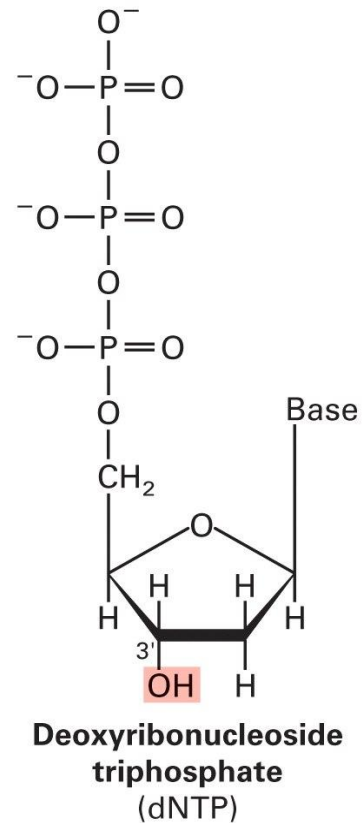
- **Sanger et al. (1977)** - método enzimático, dideoxi ou de término da cadeia
- *O sequenciamento do DNA baseia-se na interrupção da síntese da cadeia complementar pela incorporação de um nucleotídeo quimicamente modificado, um **dideoxynucleotídeo**.*



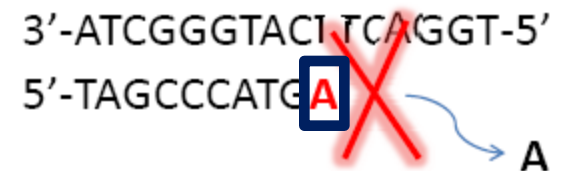


Dideoxynucleotídeo

- não tem o grupo hidroxila no carbono 3'



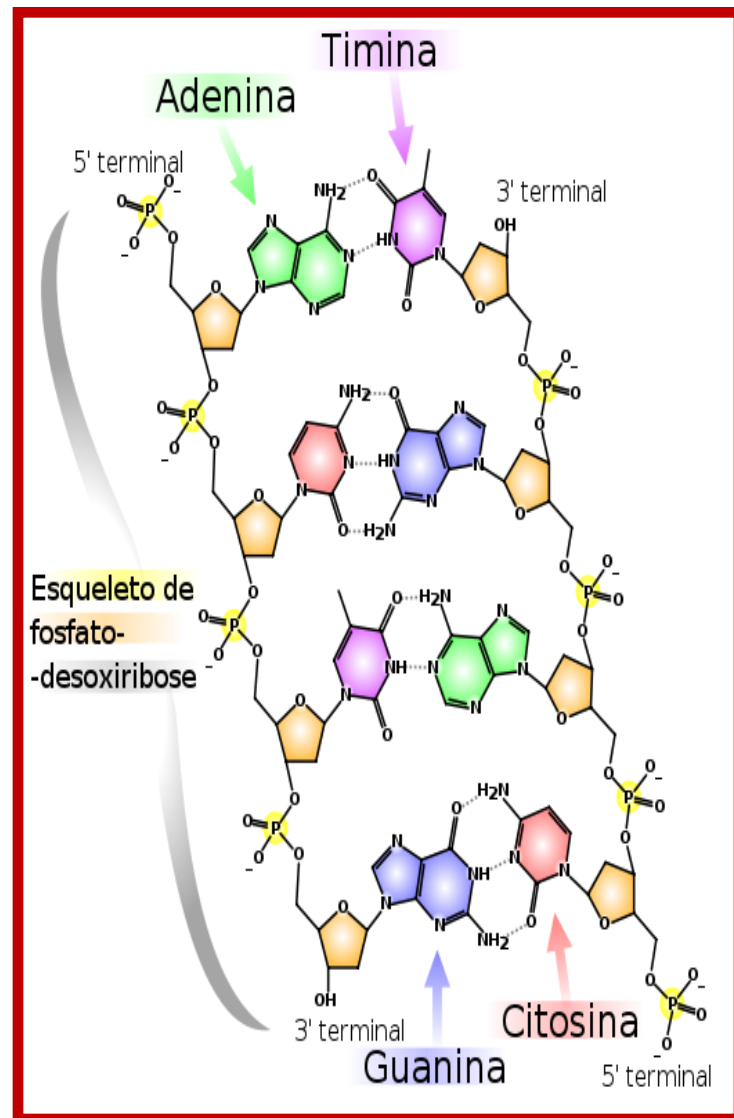
- Ligação fosfodiéster não é formada !





Relembrando...

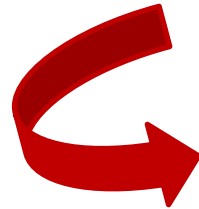
- A DNA polimerase só trabalha no sentido 5' → 3', adicionando os desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) ingressantes na extremidade 3' OH de uma seqüência pré-existente, obedecendo o pareamento complementar determinado pela fita molde





A tecnologia do sequenciamento exige:

- pequenos fragmentos de DNA
- grande quantidade de um trecho de DNA que queremos sequenciar

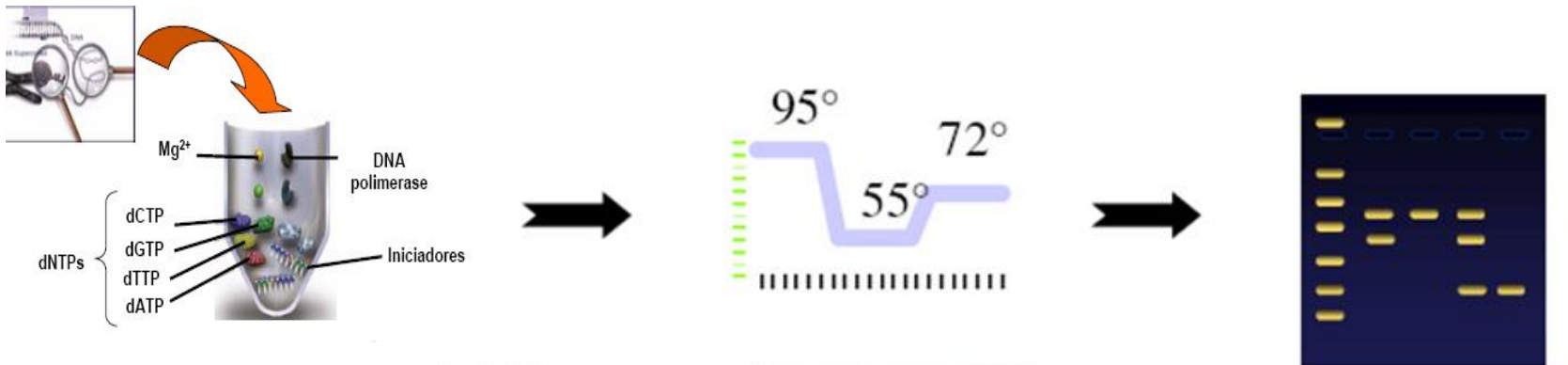


PCR



Reação em cadeia da polimerase (PCR)

- Todo esse processo é realizado *in vitro* em um equipamento chamado **termociclador**
- Produção de várias cópias de uma seqüência específica DNA



Reagentes de PCR

DNA molde

Iniciadores (*primers*)

dNTPs (dATP; dCTP; dGTP; dTTP)

Taq DNA polimerase

(termoestável)



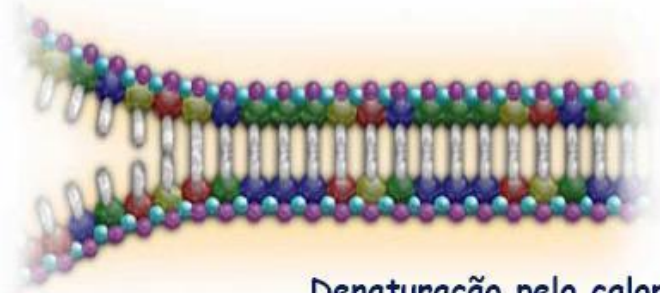
Termociclador (~30 ciclos)

Produtos de PCR

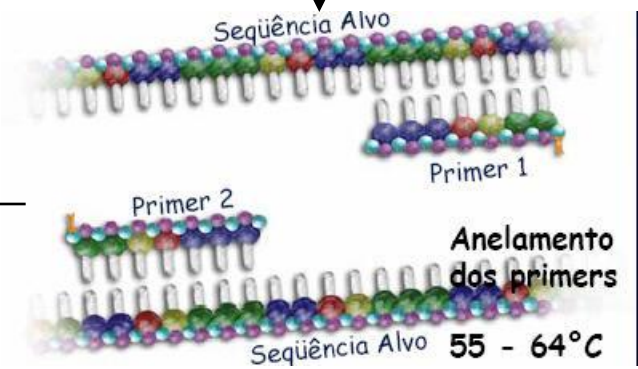
Eletrofose em gel de agarose

Etapas da PCR

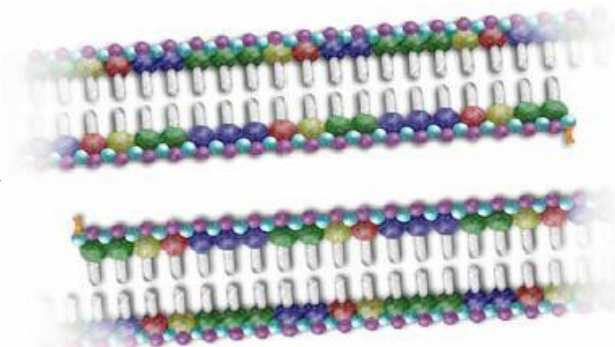
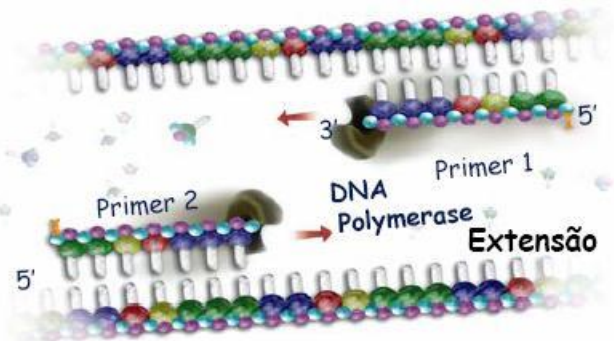
1



2



3





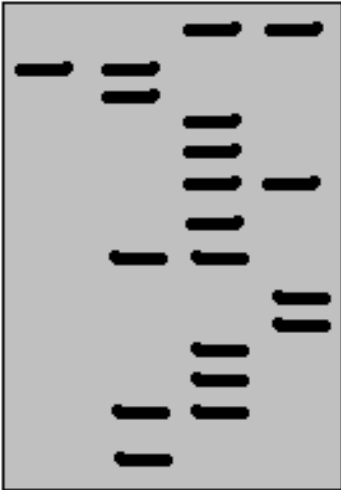
Vídeo

<http://www.youtube.com/watch?v=vpAyYYArB0Y&feature=related> ou

DVD



Método de Sanger

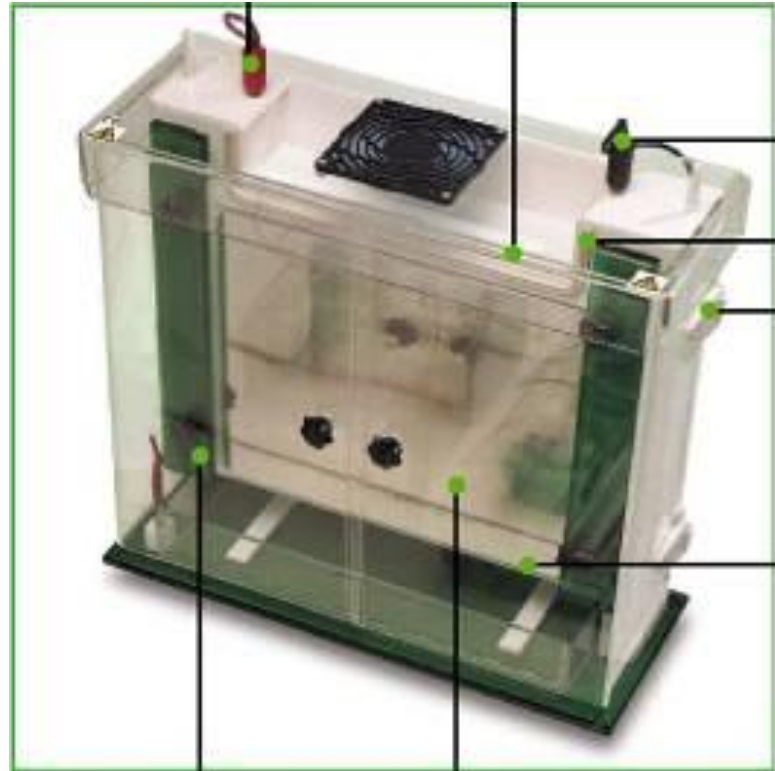


- **Seqüenciamento manual**
 - Géis de poliacrilamida em placa
 - Radioisótopos
 - Leitura manual
-
- Reação de seqüenciamento
– amplificação linear



Eletroforese

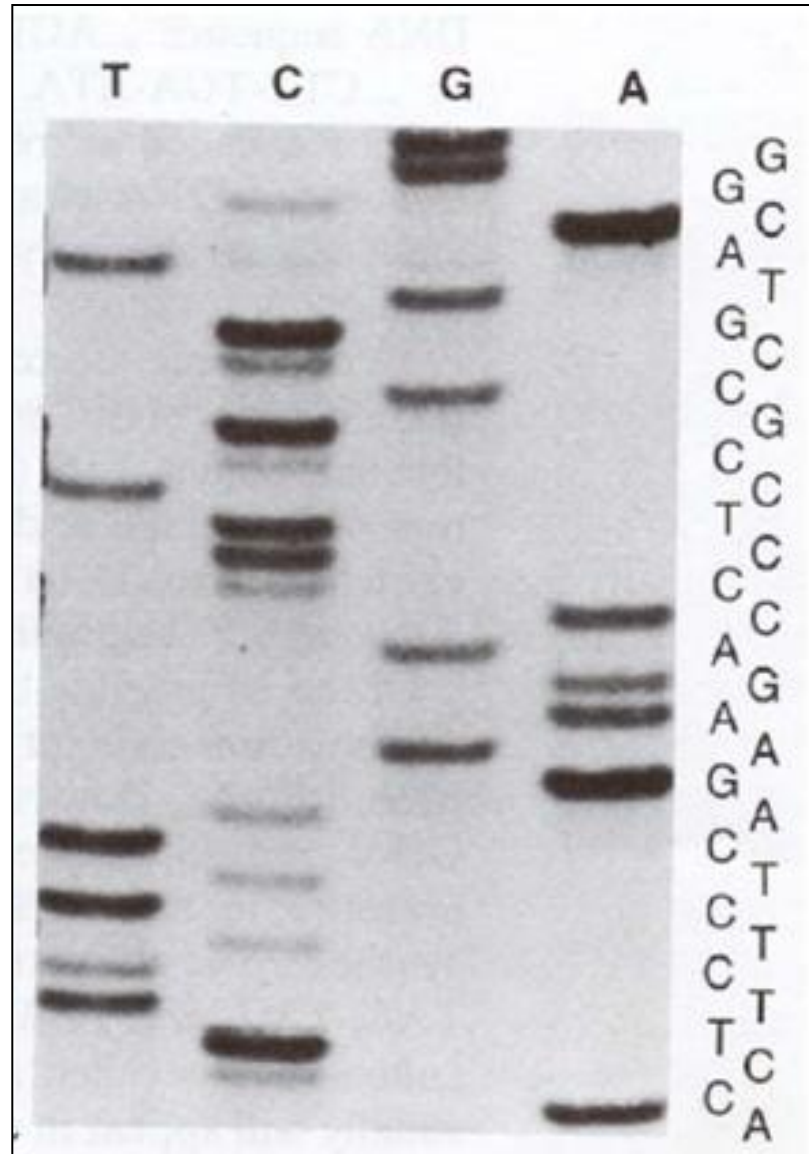
- em placa





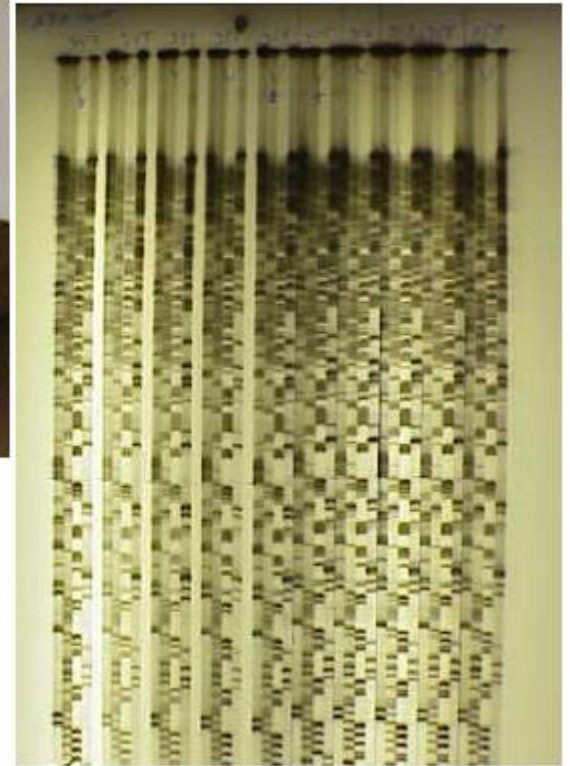
Leitura

- manual





SEQÜENCIAMENTO MANUAL





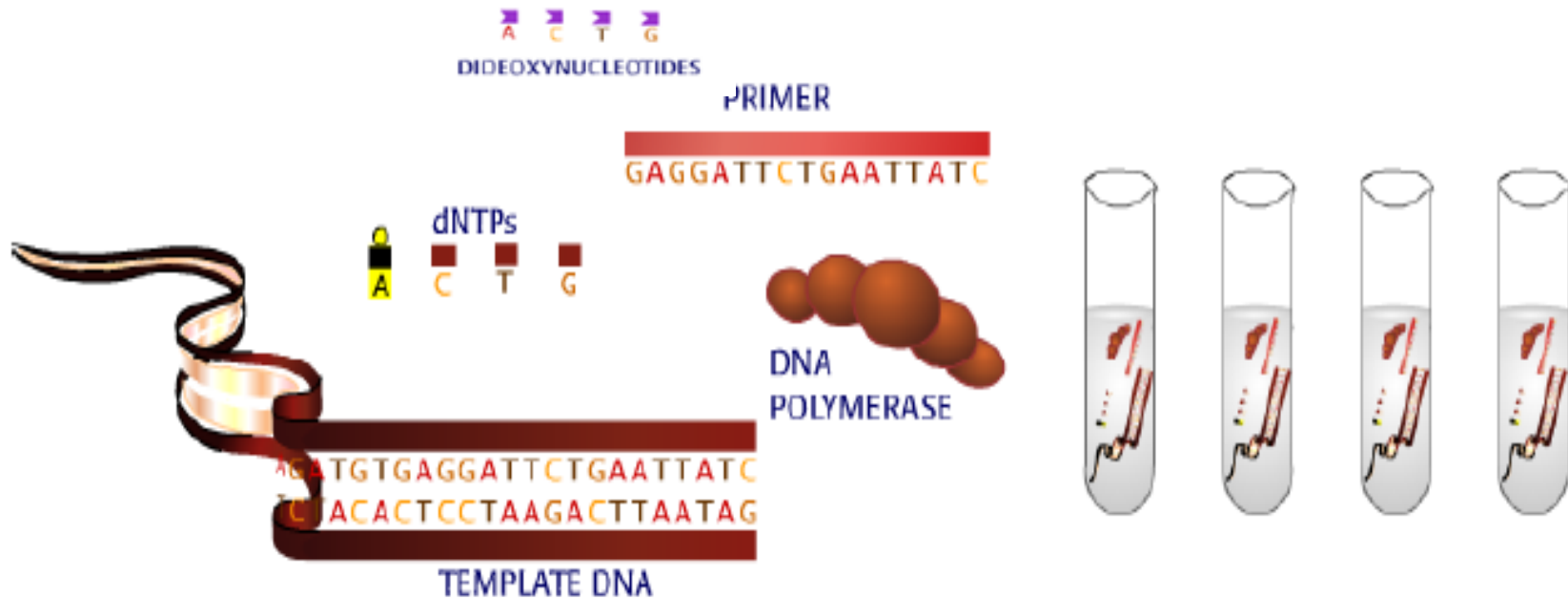
Método dideoxi ou de terminalização

- O princípio geral desta técnica é efetuar a síntese de uma fita de DNA “marcada” complementar à fita da qual se deseja determinar a seqüência

PCR



Método dideoxi ou de terminalização

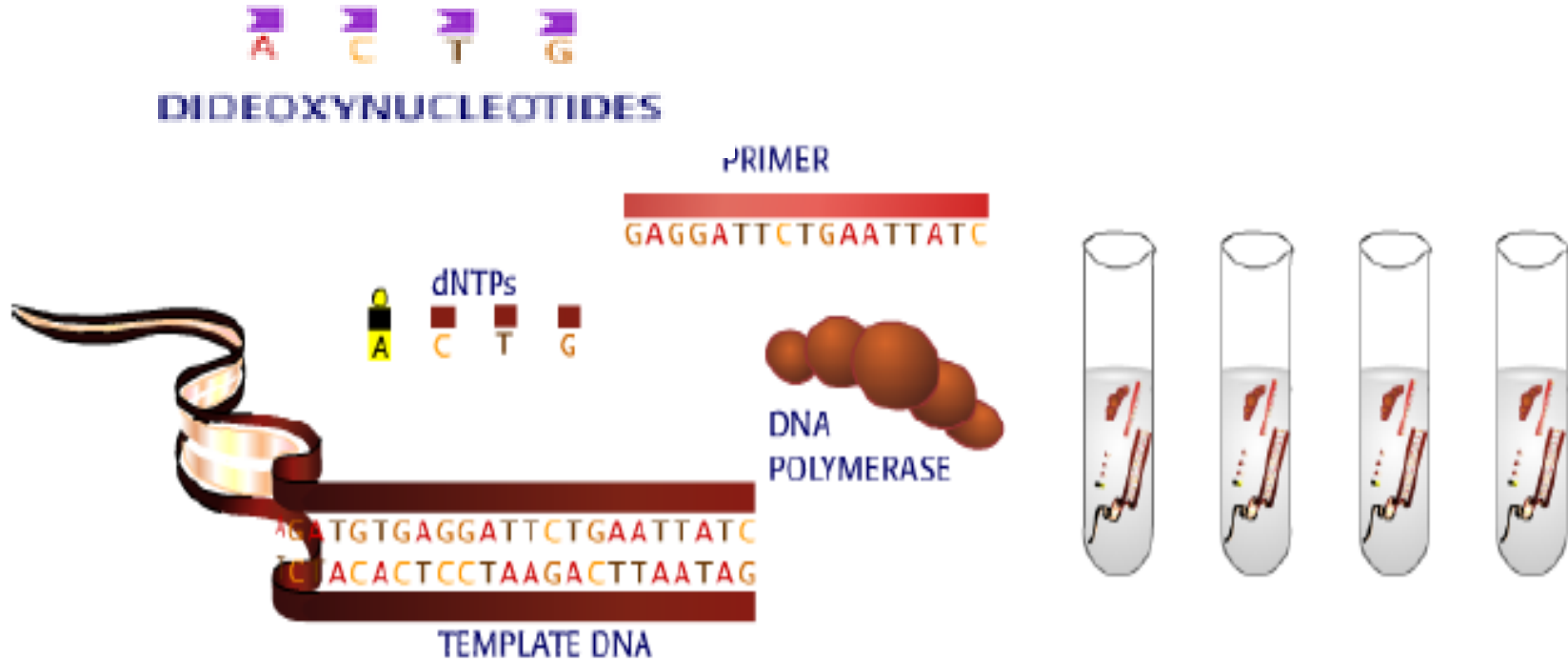


- DNA fita simples
- DNA polimerase
- Primer
- dNTP (A C G T)
- ddNTP (A C G T)

Um marcado radioativamente – ^{32}P dATP

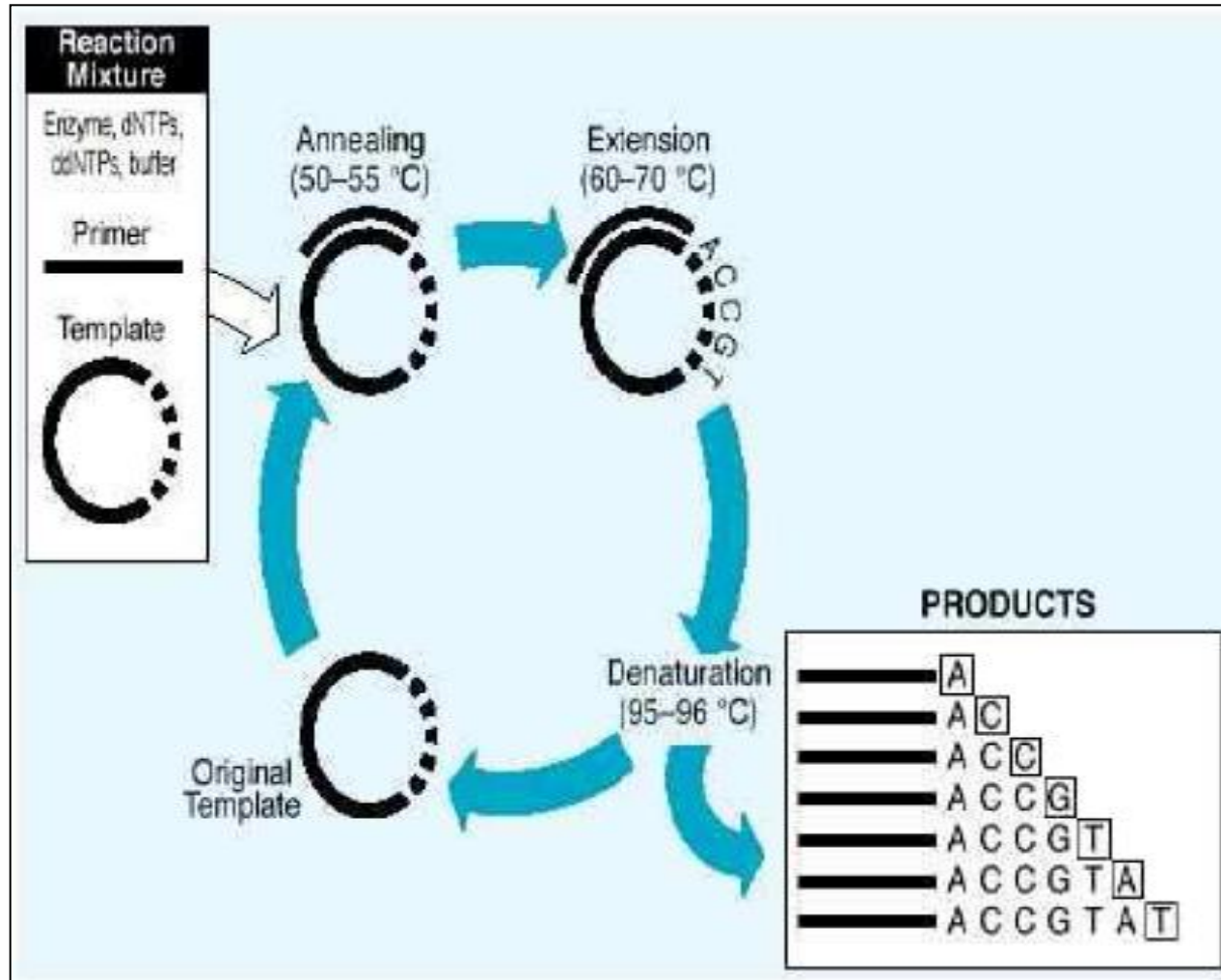


Método dideoxi ou de terminalização



- DNA fita simples
- DNA polimerase
- Primer
- dNTP (A C G T)
- ddNTP (A C G T)

Um marcado radioativamente – ^{32}P dATP

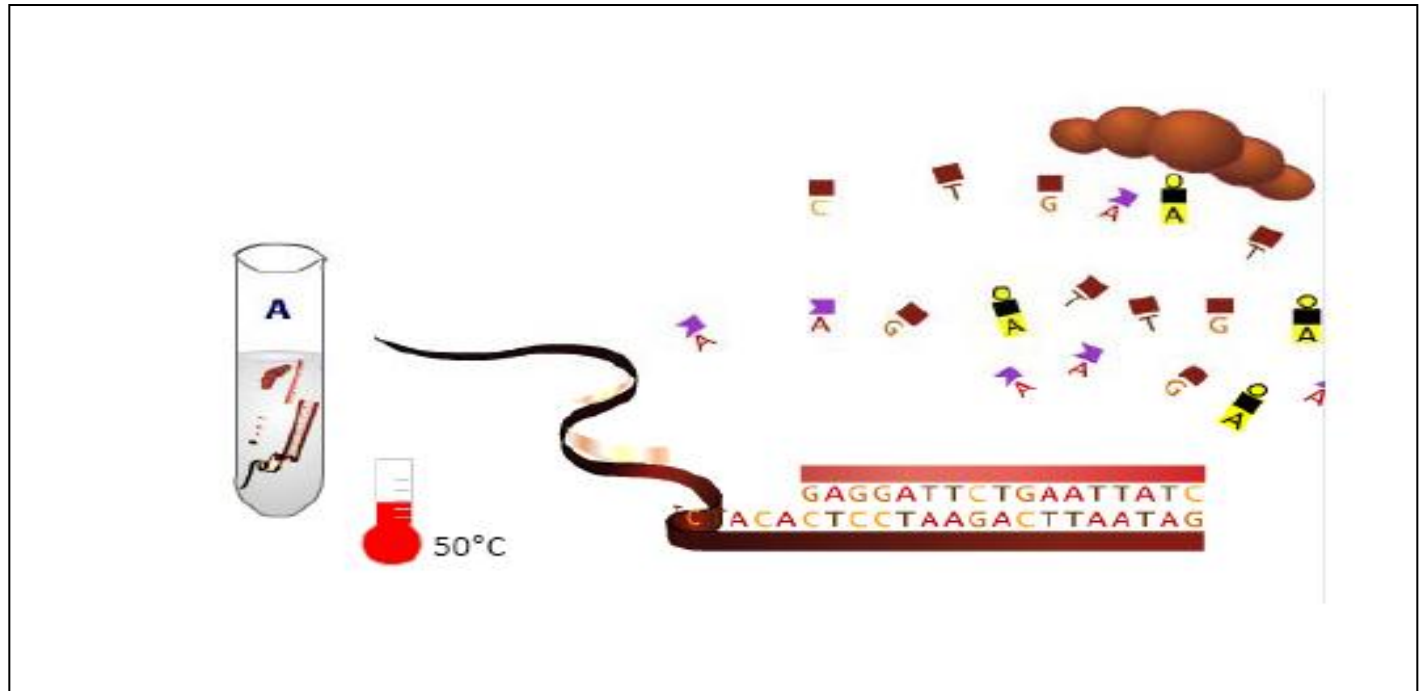


O primeiro passo é a obtenção de fitas simples do DNA que se deseja seqüenciar

DESNATURAÇÃO

Método dideoxi ou de terminalização

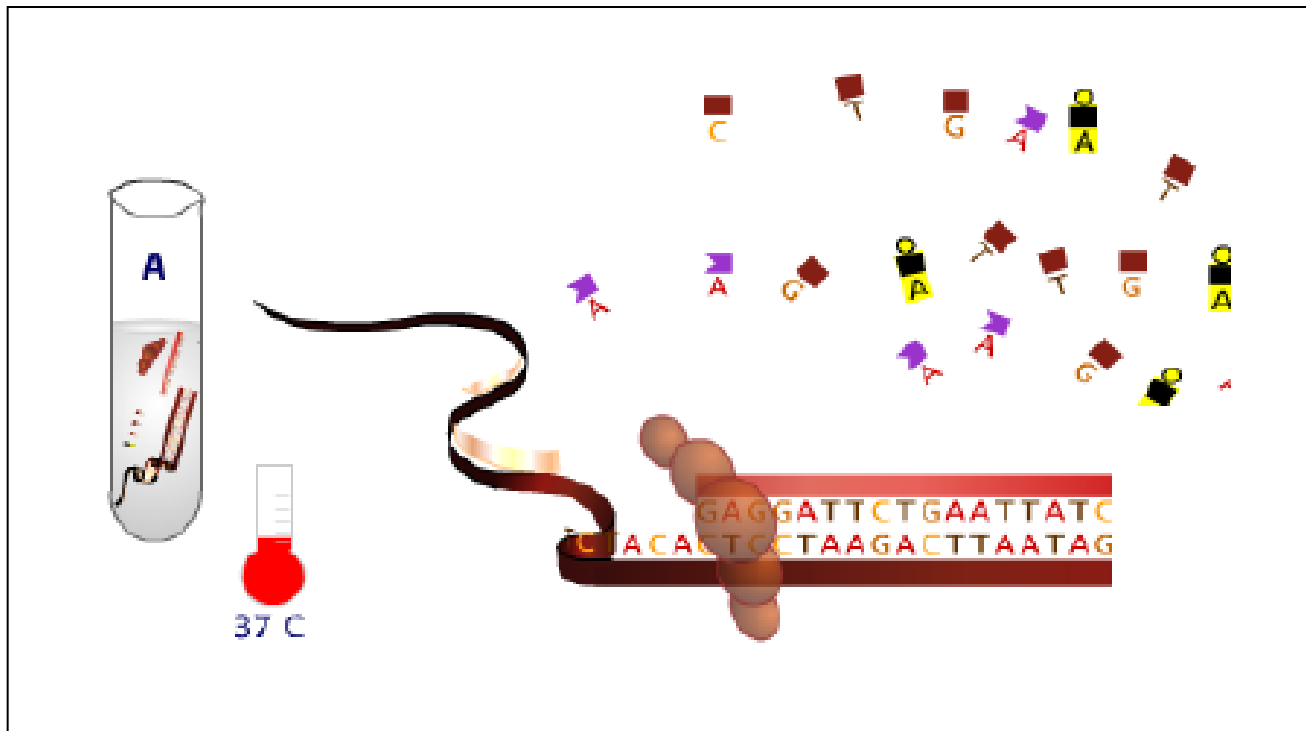
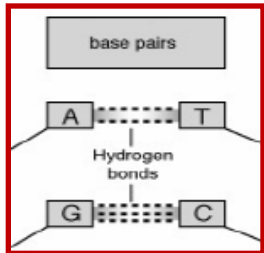
O alongamento do primer é um processo enzimático !



Com as fitas separadas, a síntese de DNA é iniciada por um oligonucleotídeo – **primer** que se liga a fita molde

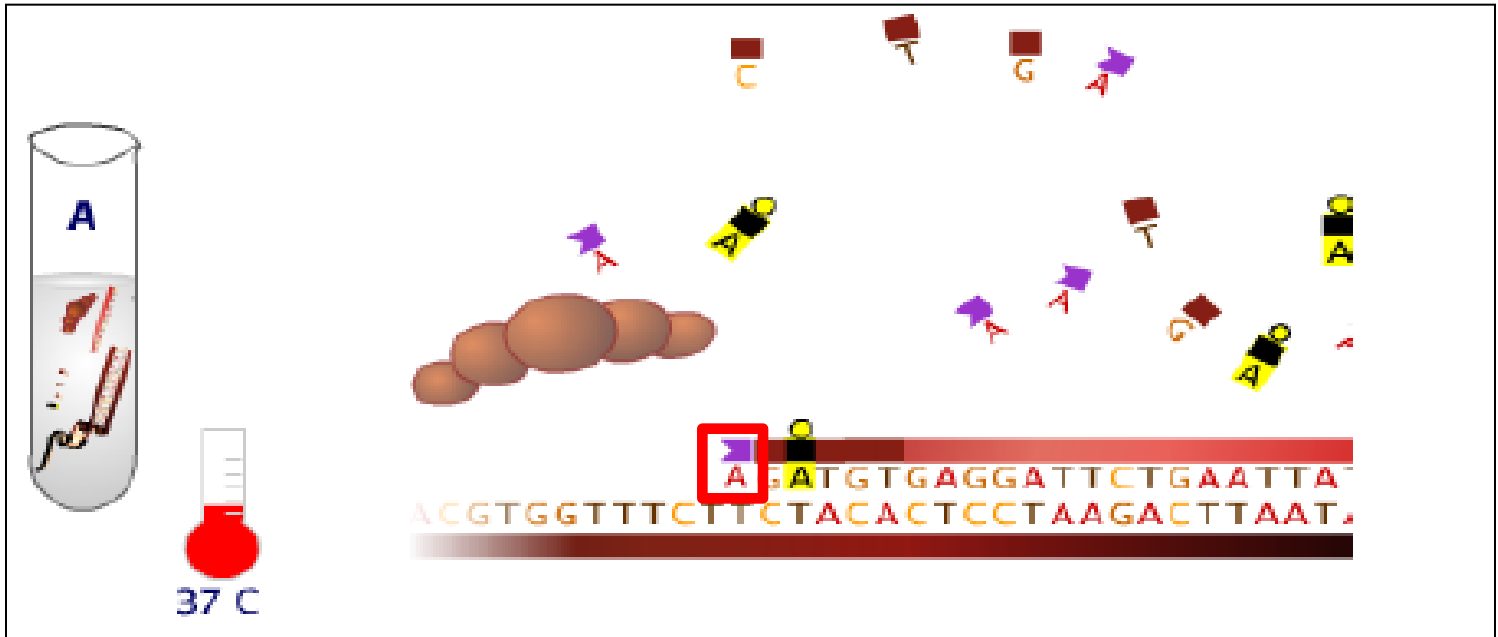
Método dideoxi ou de terminalização

*complementariedade das bases nitrogenadas



A **DNA polimerase** continua ao longo da seqüência molde, incorporando os nucleotídeos na extremidade 3' do primer e sintetizando a fita nova

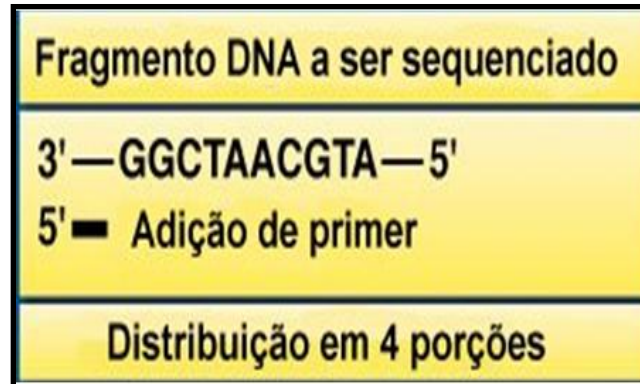
Método dideoxi ou de terminalização



A polimerização do DNA prossegue, com a inclusão dos nucleotídeos “normais”, até que, por acaso, a DNA polimerase insere um **dideoxinucleotídeo**, o que interrompe a polimerização



Método dideoxi ou de terminalização

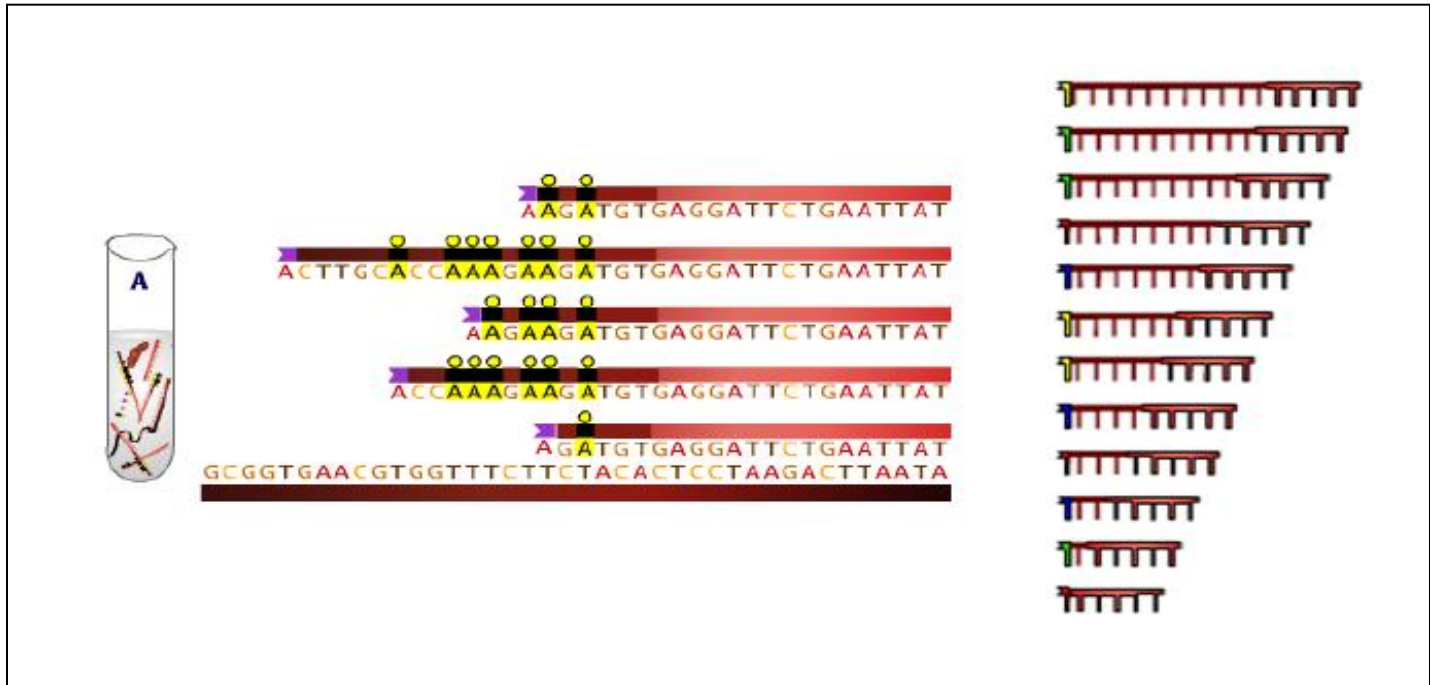


- O **terminador** (ddNTP-dideoxinucleotídeo) competirá com o desoxirribonucleosídeo trifosfatado análogo (dNTP) e interromperá a cadeia sempre que for incorporado, gerando fragmentos de diferentes tamanhos
 - ddNTP em quantidade inferior aos dNTPs normais



Método dideoxi ou de terminalização

Fim da Reação de Sequenciamento

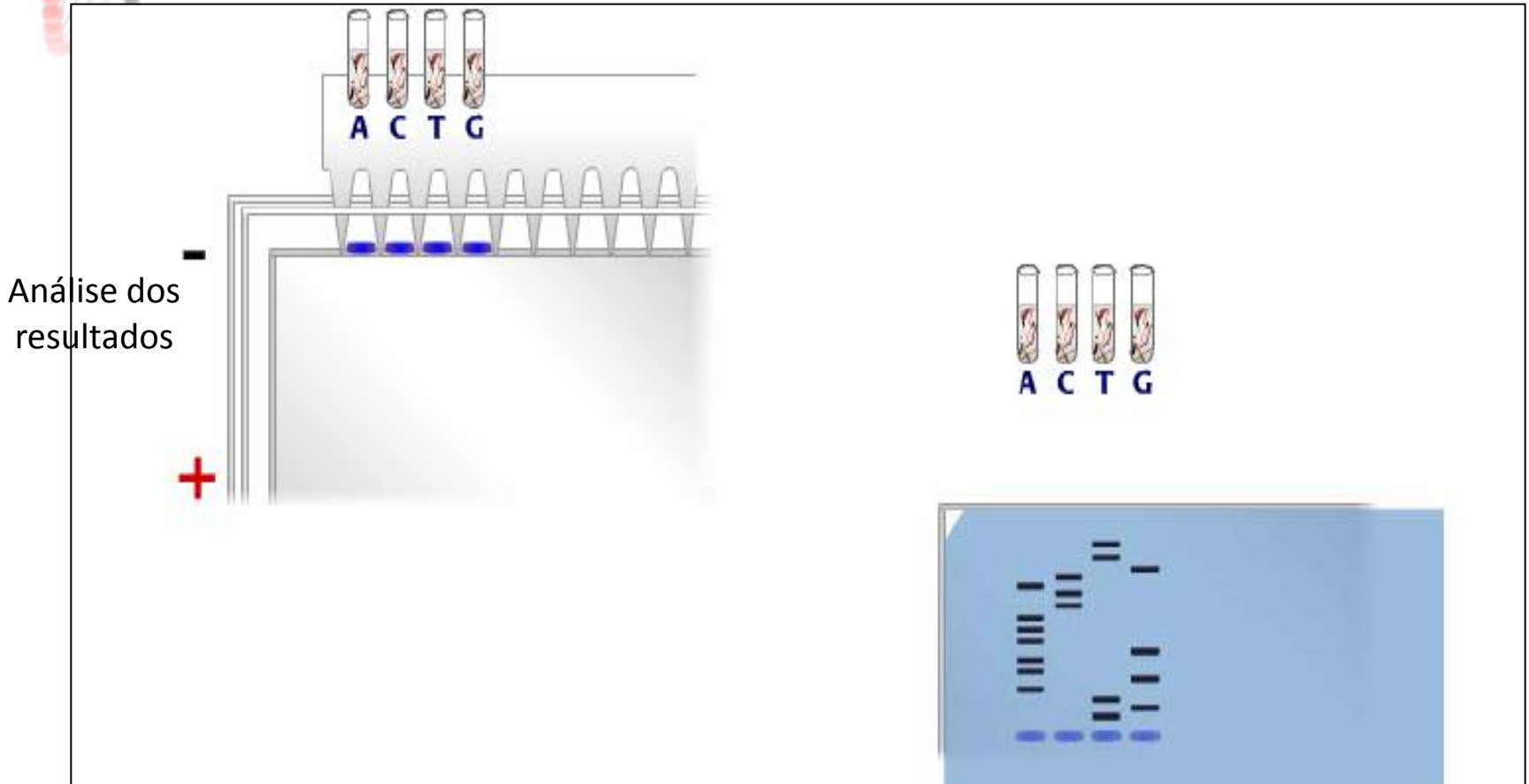


Ao final desse processo, obteremos

fragmentos de tamanhos diferentes –
correspondente a cada posição de terminação da cadeia



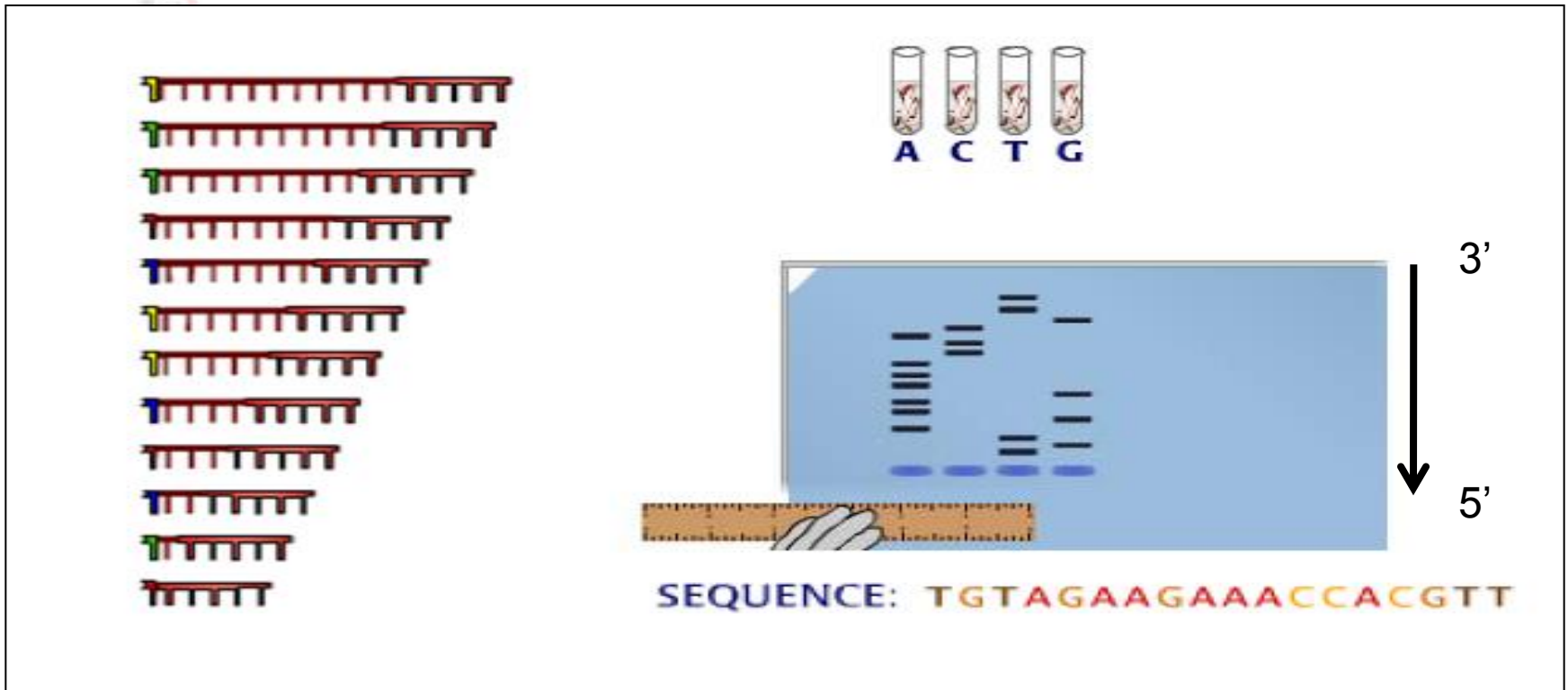
Método dideoxi ou de terminalização



Cada uma das quatro misturas é colocada em um gel poroso (**poliacrilamida**), no qual, após a eletroforese, se observa uma banda correspondente a cada posição de término da cadeia



Método dideoxi ou de terminalização



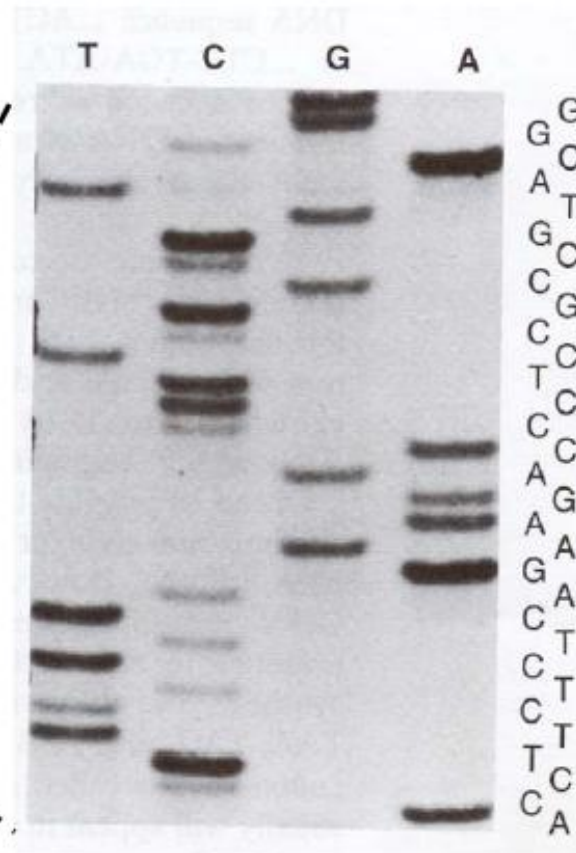
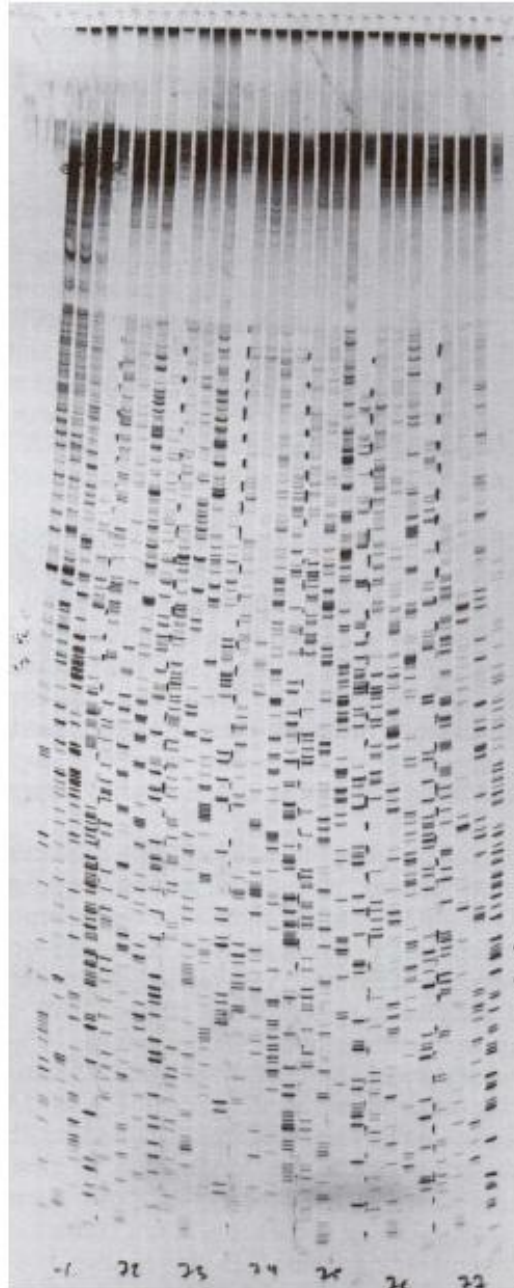
A seqüência da fita recém-formada complementar à do DNA molde pode ser lida diretamente no gel de seqüenciamento



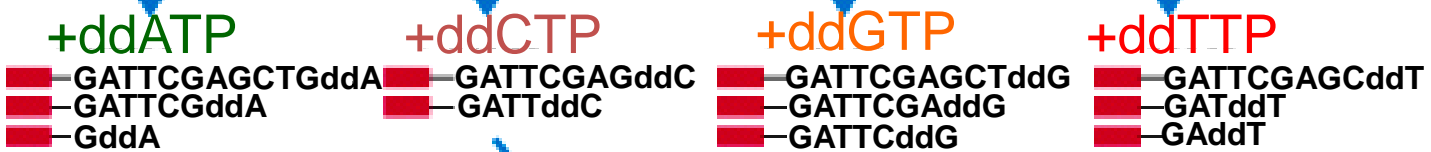
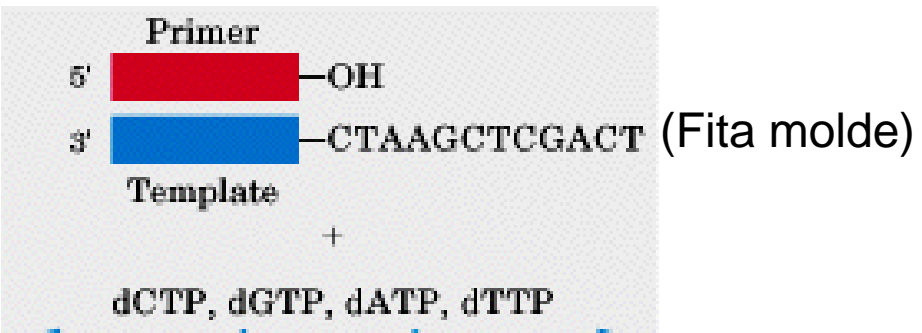
Auto-radiografia para obtenção de resultados – após nucleotídeos radioativos (dNTPs marcados com ^{32}P) serem separados o gel é colocado em contato com um filme radiográfico; os nucleotídeos marcados impressionam as partes do filme com as quais estão em contato – aparecem como bandas escuras



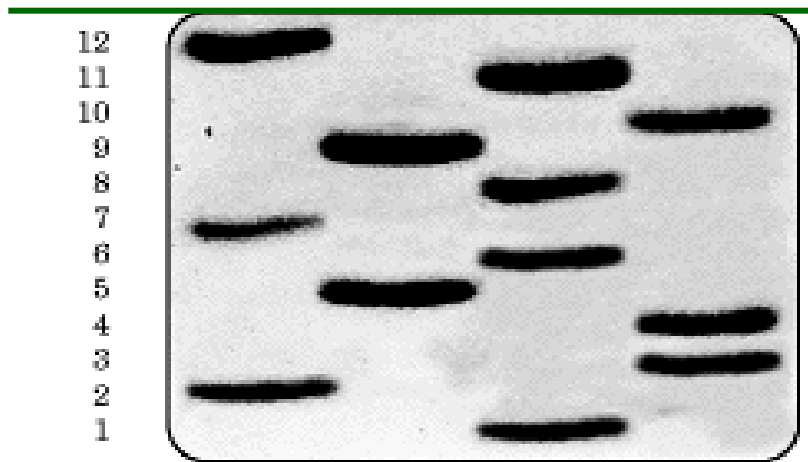
Autorradiograma de um gel de sequenciamento de DNA



Sequenciamento Manual Resumo



A C G T



Autoradiogram of electrophoresis gel

Sequence of complementary strand

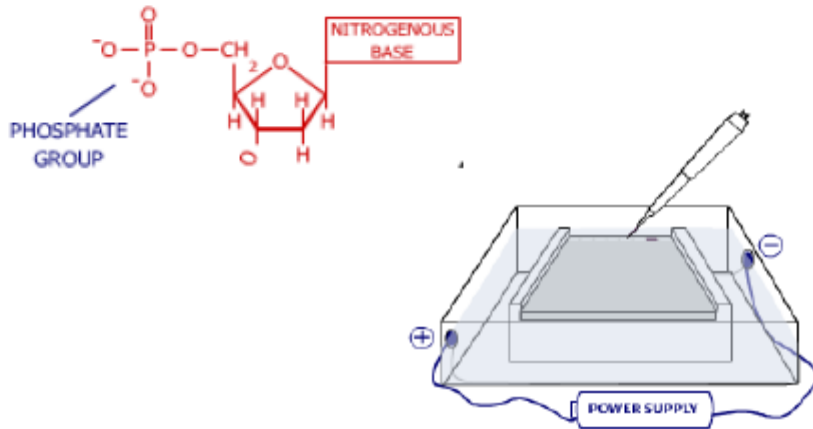
(c)



Primeiras tentativas

Limitações

- Leitura das bases realizada manualmente



- Dificuldade em implementar procedimentos em larga escala com este tipo de abordagem

Primeiras tentativas

Limitações

- Radioisótopos – danosos à saúde
- Substituição das técnicas de detecção por radioatividade pelo uso de marcadores fluorescentes
- Fluorófos – sistema de detecção que permite a leitura automática das seqüências
- Utilização ddNTPs fluorescentes lidos automaticamente durante a eletroforese



vídeo

<http://www.youtube.com/watch?v=f1ifyEJ2Gjs>

* <http://www.dnalc.org/view/15923-Cycle-sequencing.html>



SECUENCIAMIENTO AUTOMÁTICO





Método automático, fluorescente

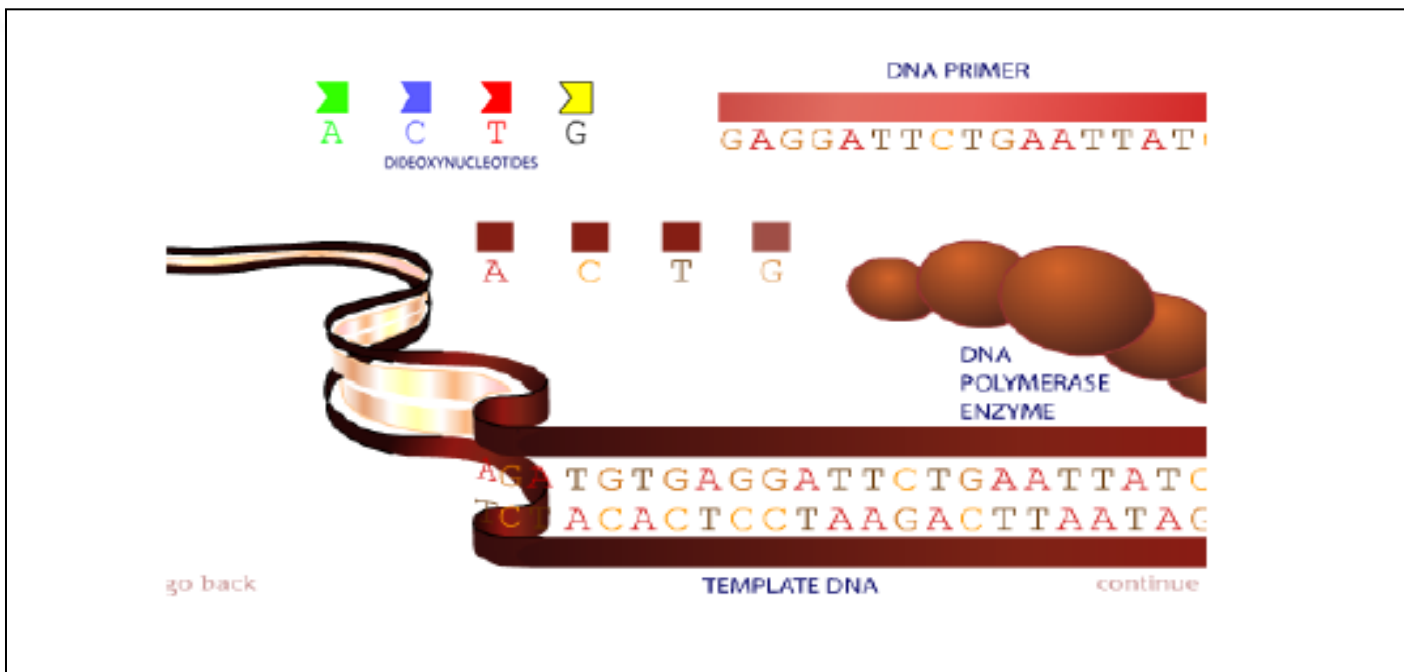
variação do método clássico onde se utiliza uma única mistura reativa com um **marcador fluorescente** diferente para cada um dos ddNTPs



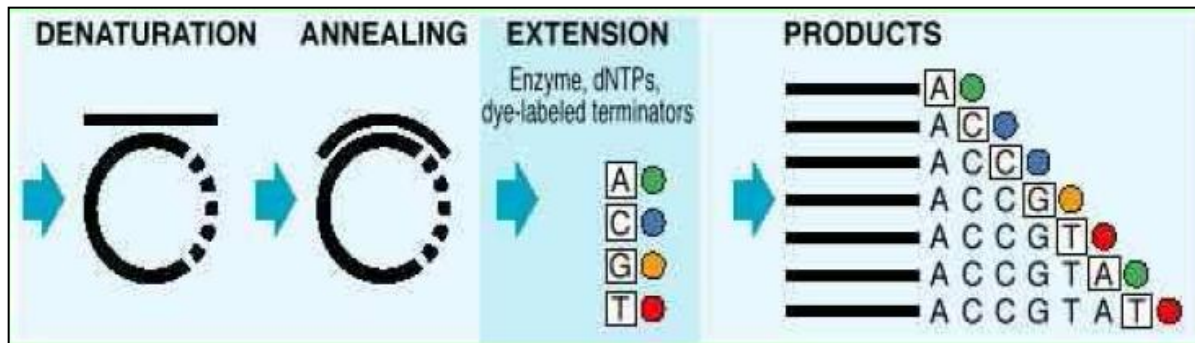
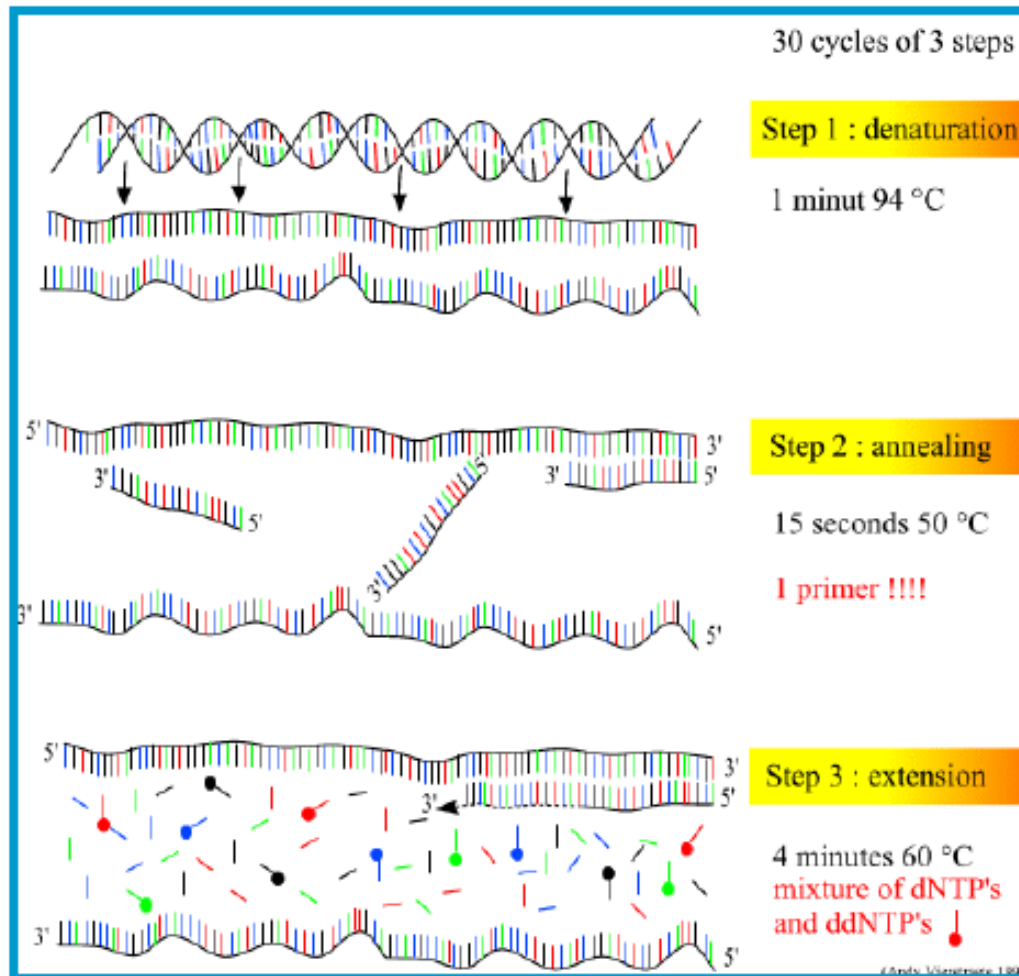


Método automático, fluorescente

- 1986- Método dideoxi automático



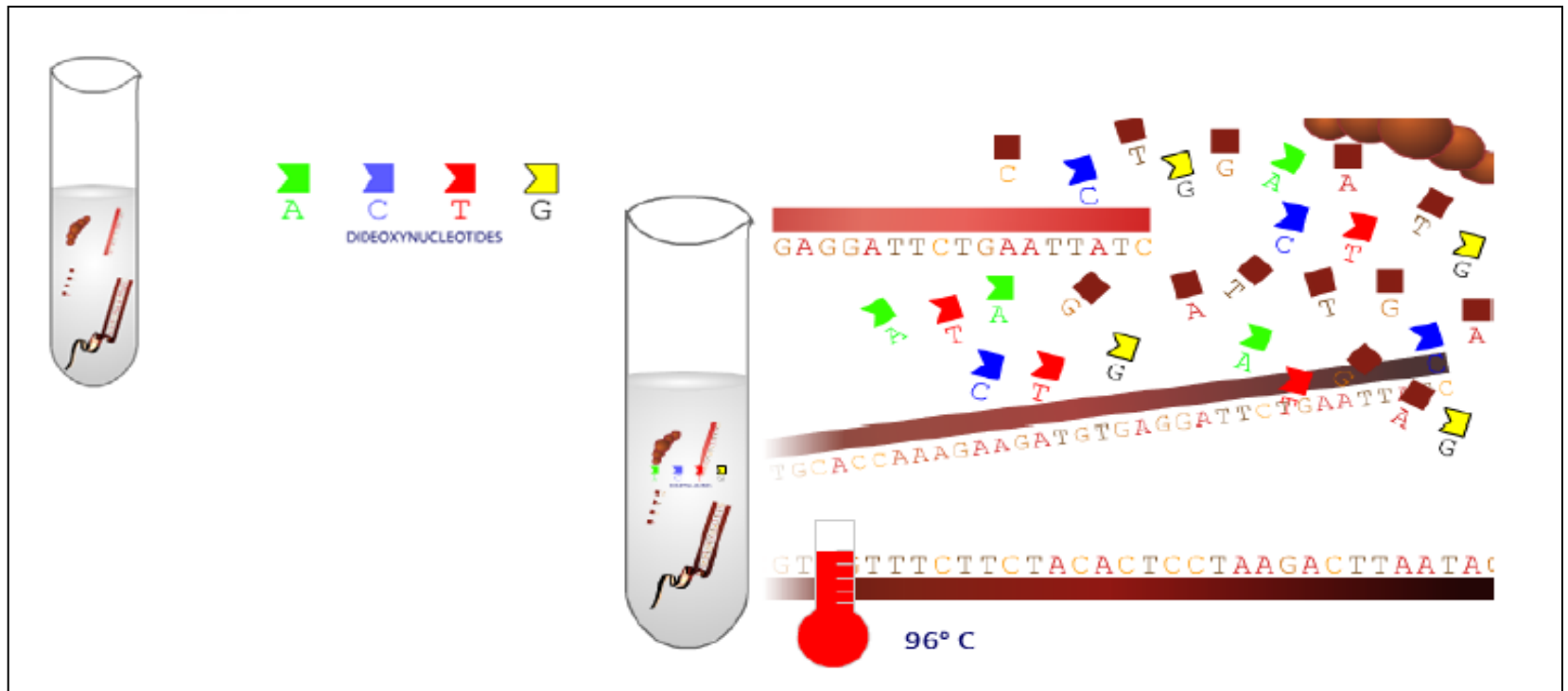
- DNA fita simples
- DNA polimerase
- Primer
- dNTP (A C G T)
- ddNTP (A C G T)





Método automático, fluorescente

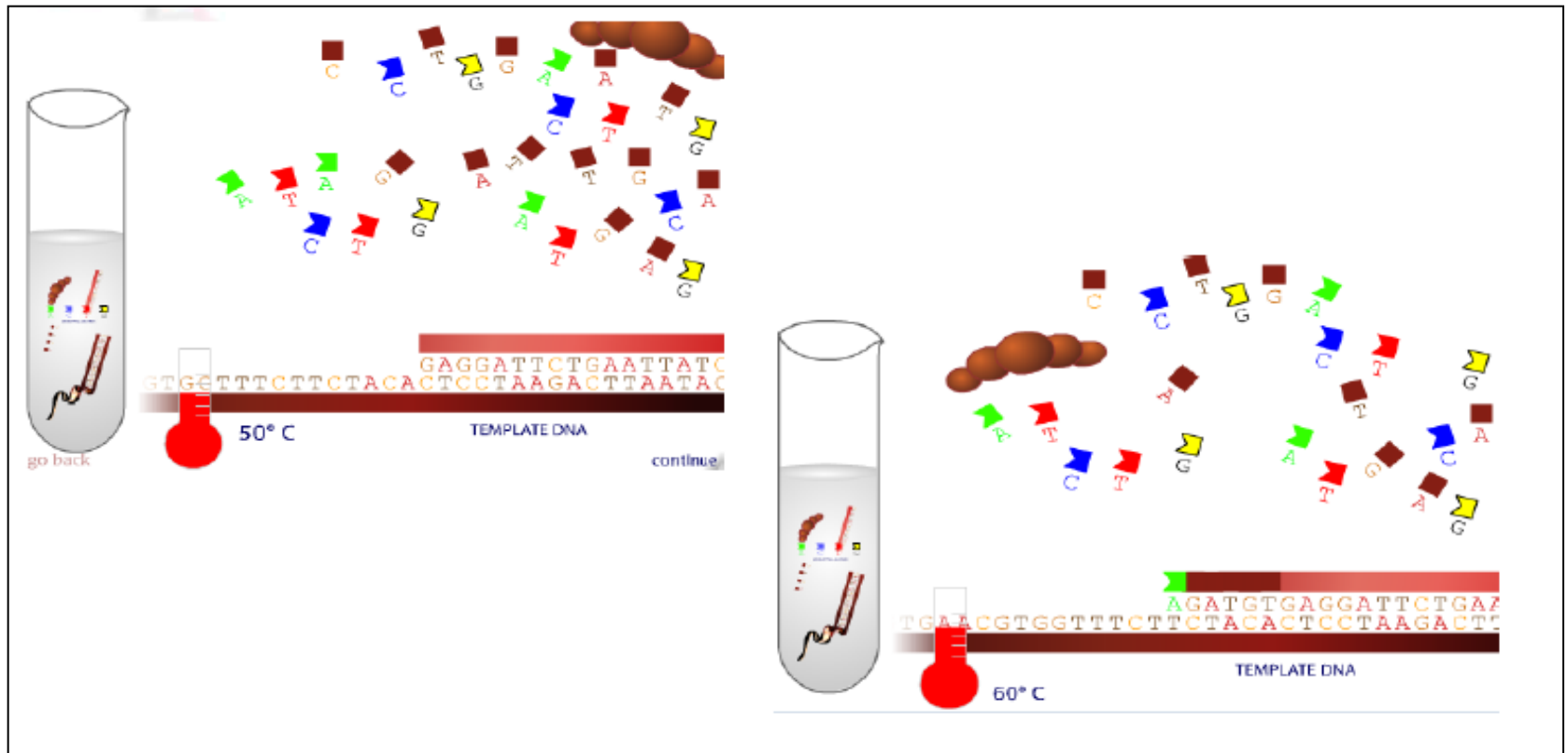
- 1986- Método dideoxi automático





Método automático, fluorescente

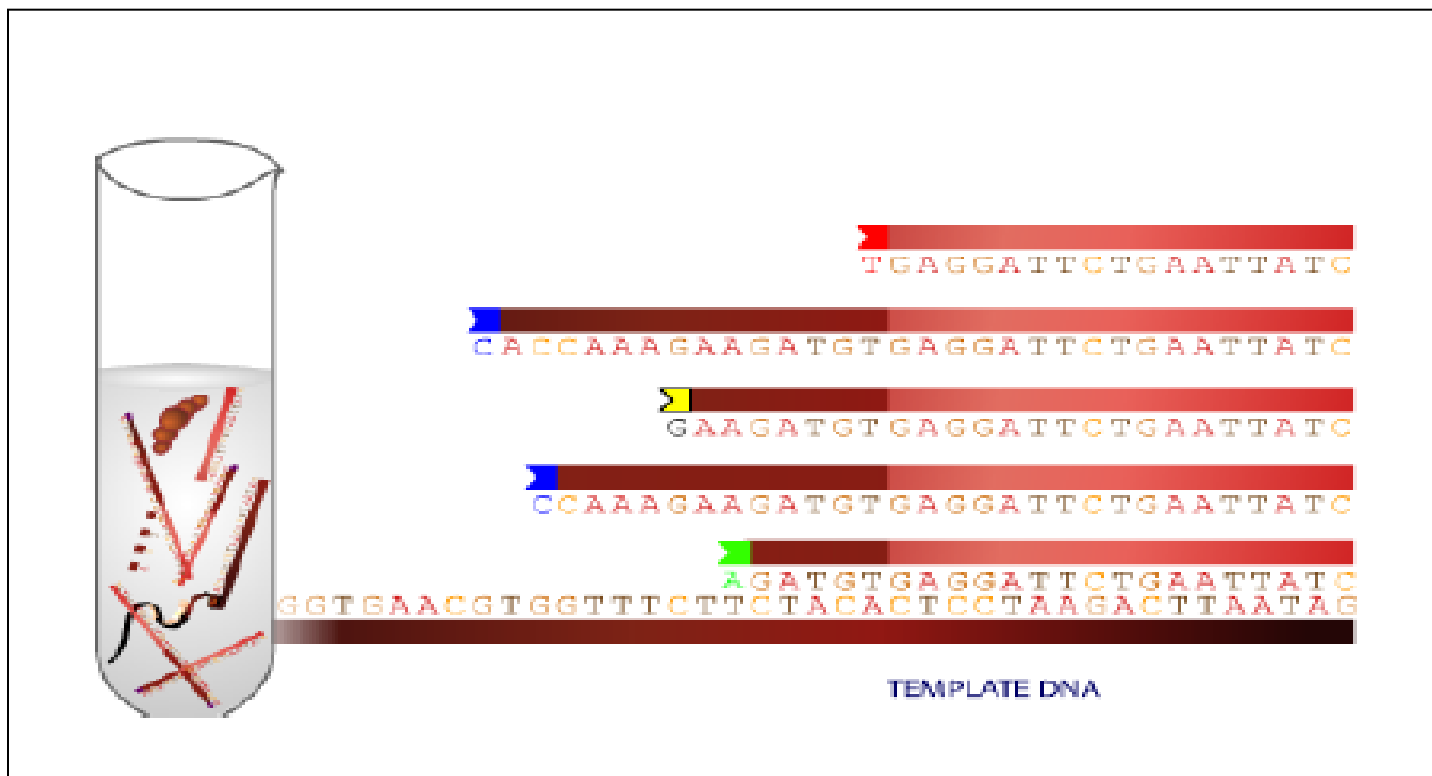
- 1986- Método dideoxi automático





Método automático, fluorescente

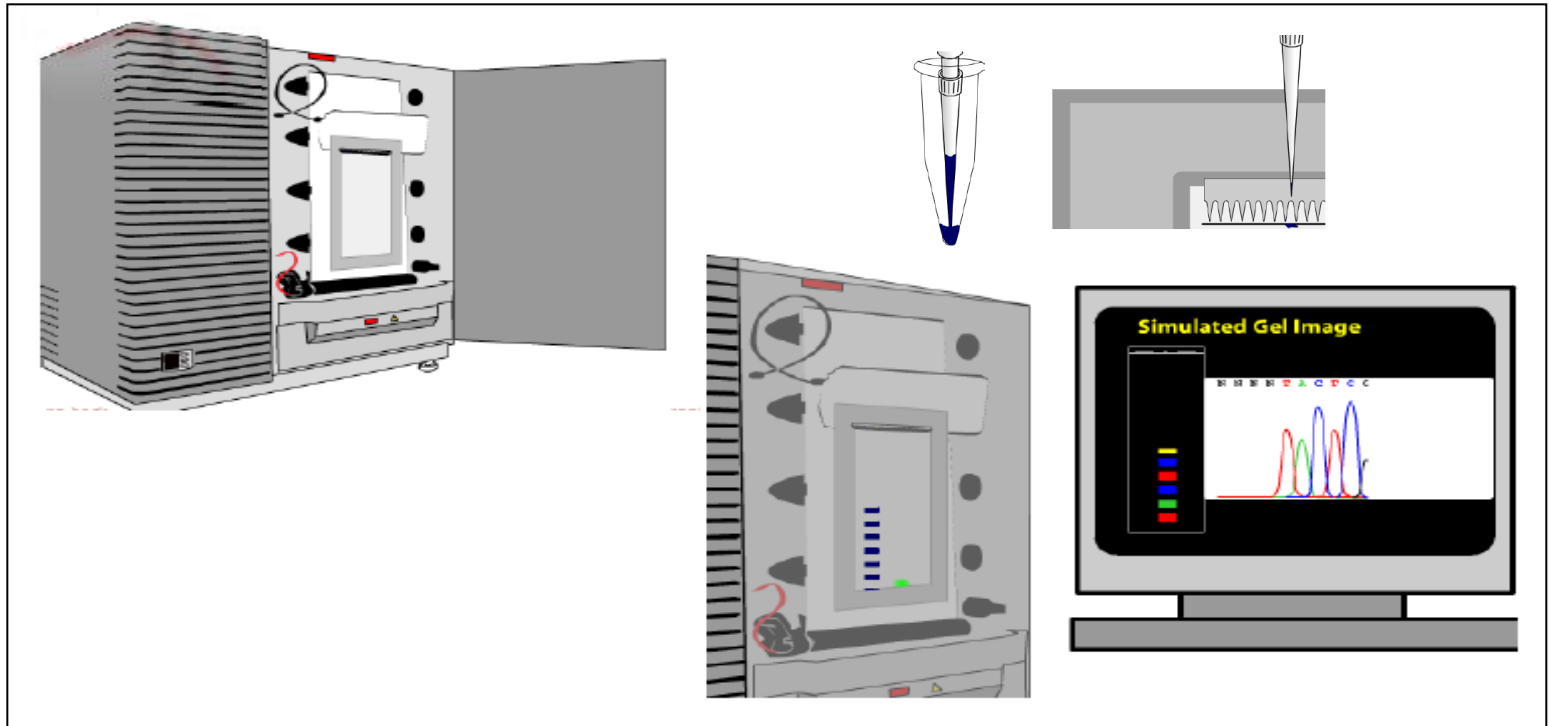
- 1986- Método dideoxi automático





Método automático, fluorescente

- 1986- Método dideoxi automático



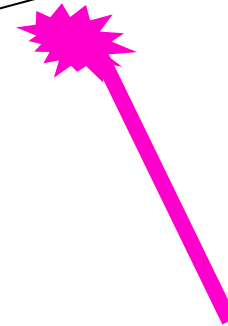
O uso de marcadores fluorescentes torna possível automatizar o seqüenciamento do DNA com todo processo controlado pelo computador



Método automático, fluorescente

- 1986- Método dideoxi automático

- Para se determinar a seqüência de bases do DNA utiliza-se uma única mistura contendo quatro compostos fluorescentes um para cada base
- Cada dideoxinucleotídeo empregado na reação está associado a um cromóforo, uma substância que apresenta uma determinada cor quando é estimulada por um feixe de laser

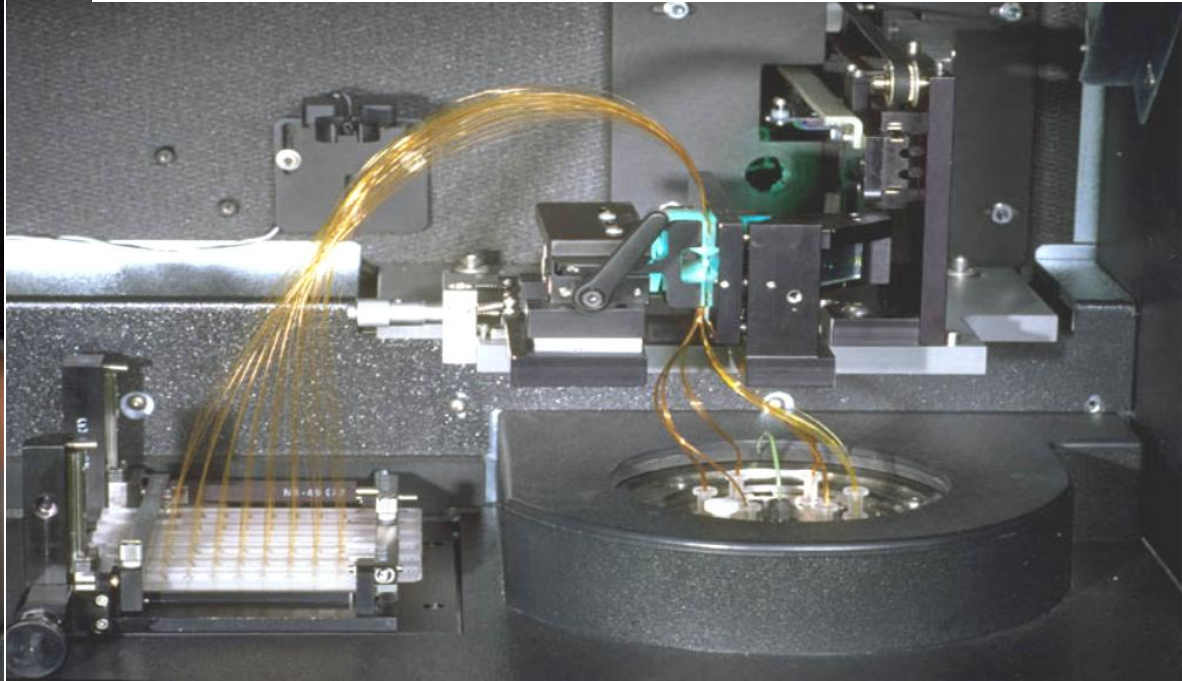
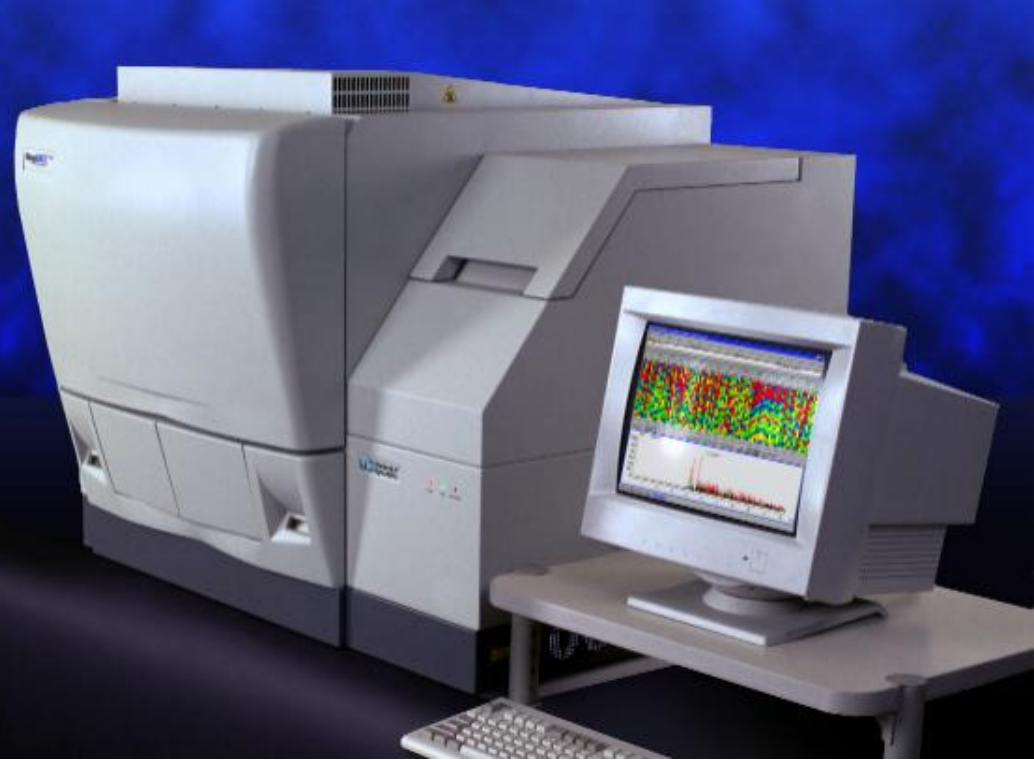


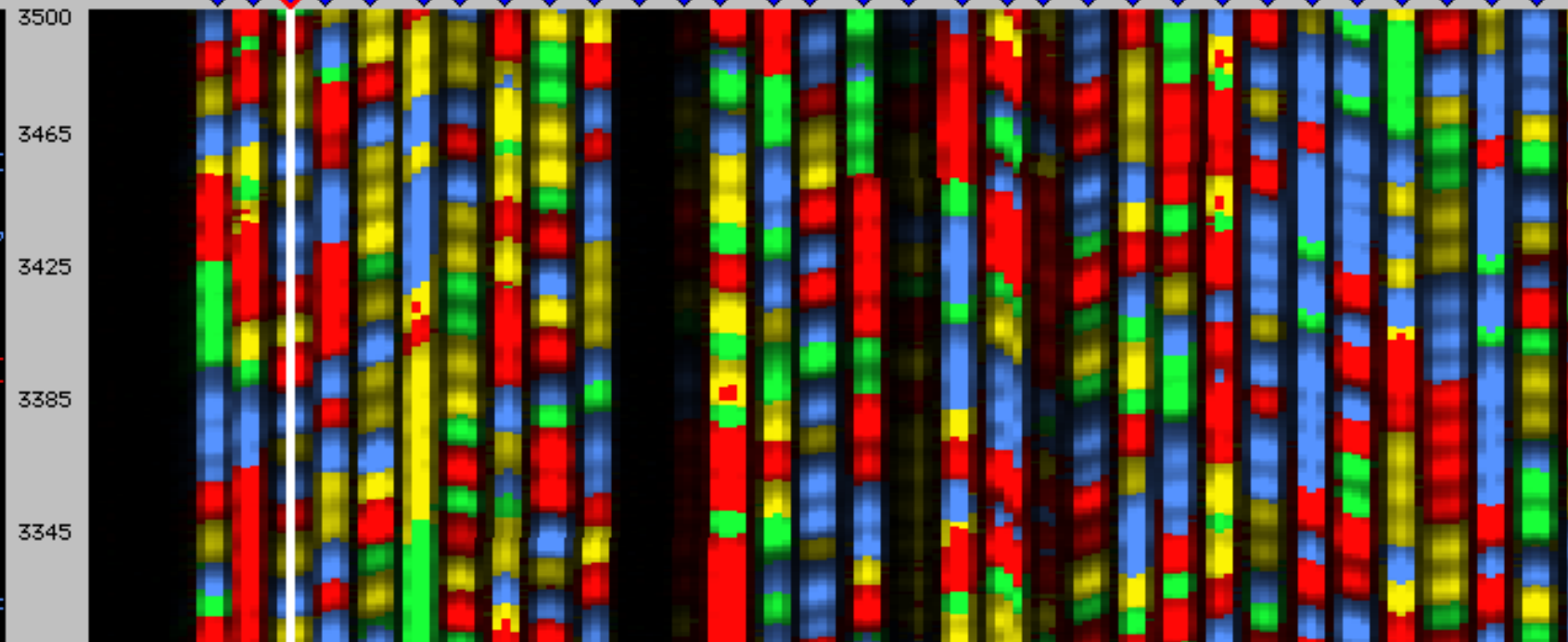
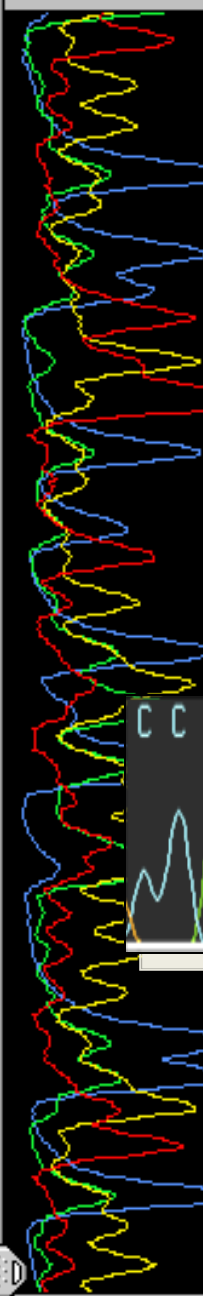


Método automático, fluorescente

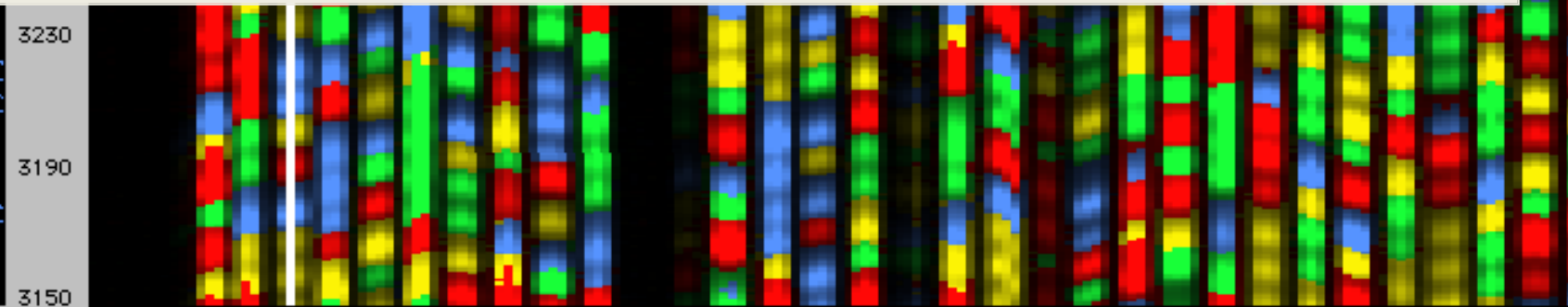
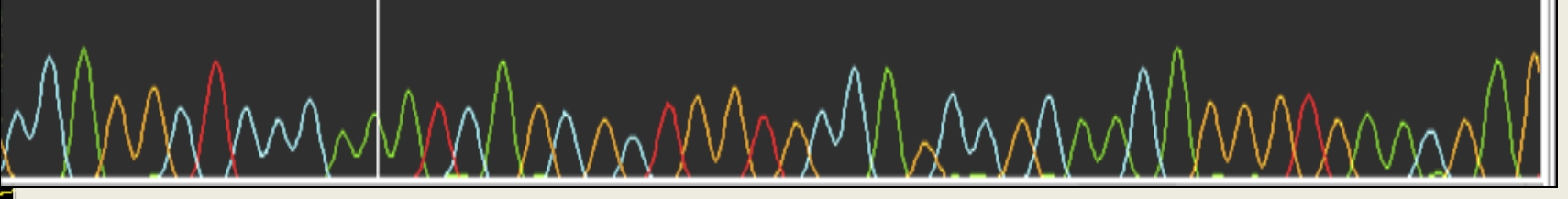
- 1986- Método dideoxi automático

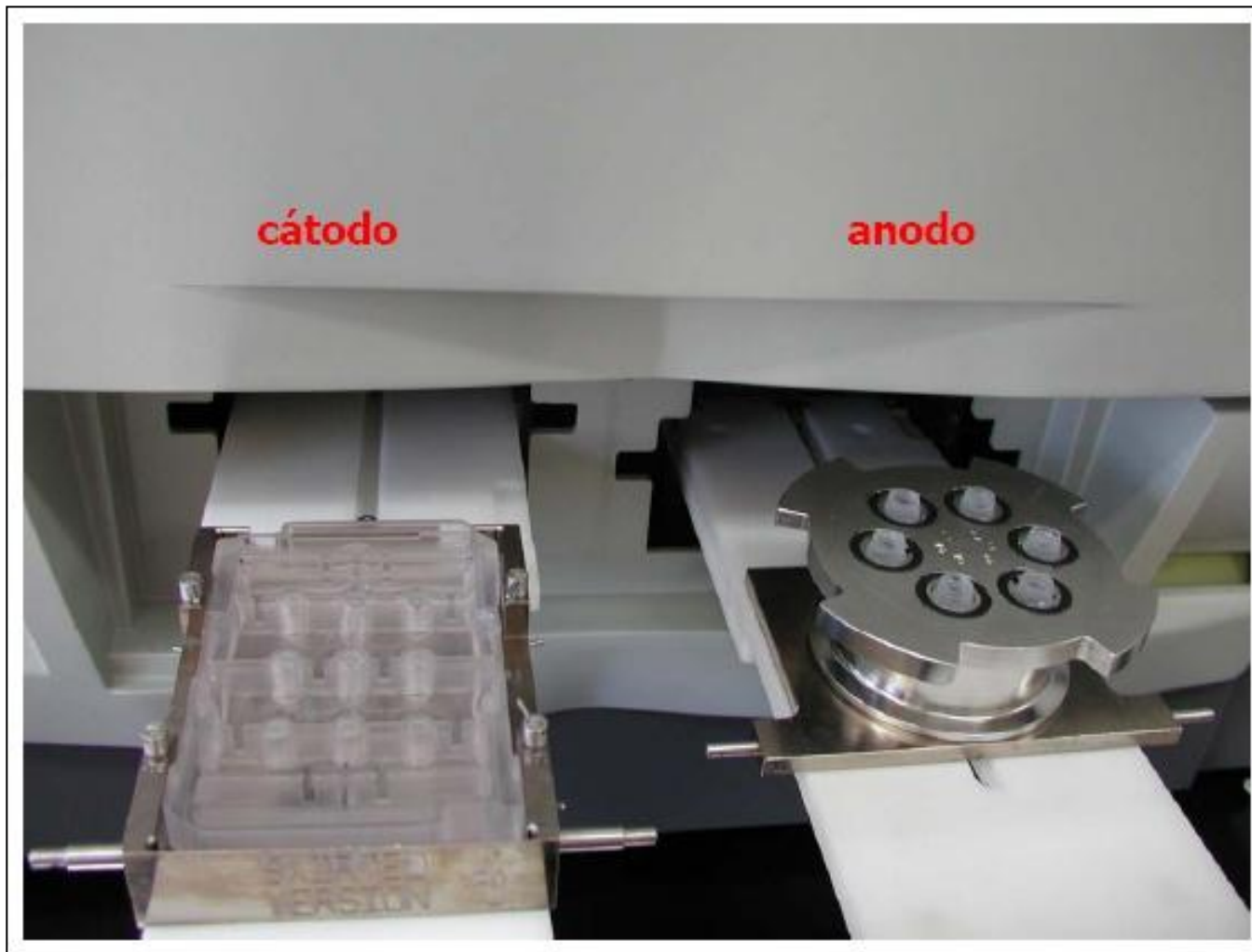
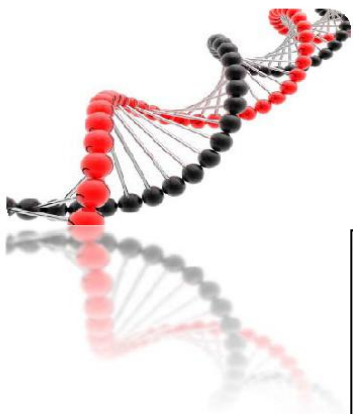
- A reação de polimerização produz uma mistura de produtos fluorescentes de vários tamanhos que são separados por eletroforese
- A eletroforese é realizada no interior de capilares preenchidos com uma matriz de poliacrilamida
- O seqüenciador detecta o sinal que é emitido por cada ddNTP fluorescente quando estimulado por um feixe de laser
- Esse sinal é analisado por programas específicos de bioinformática resultando na seqüência de DNA



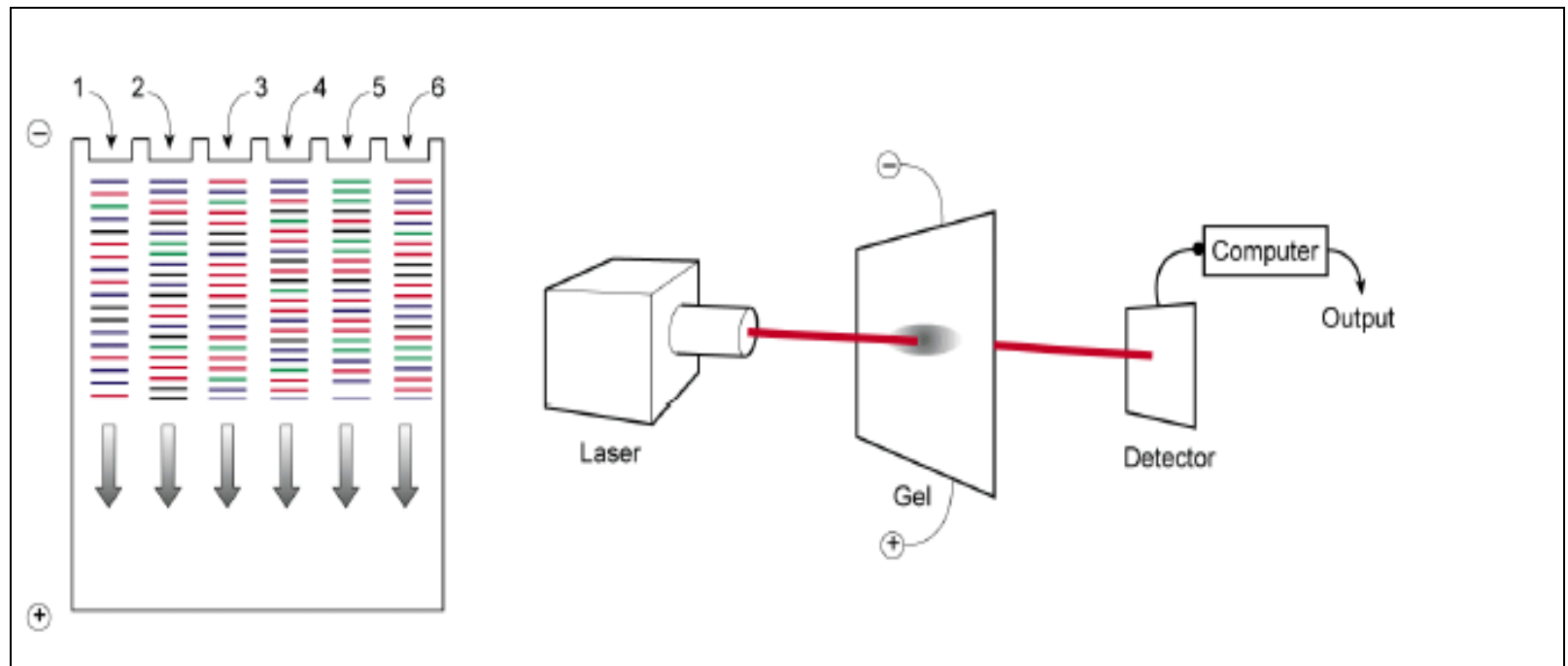


CCAGGCTCCCAAAATCAGCGCTGGTGCCAGCCGCAACAGGGTGAACGAG





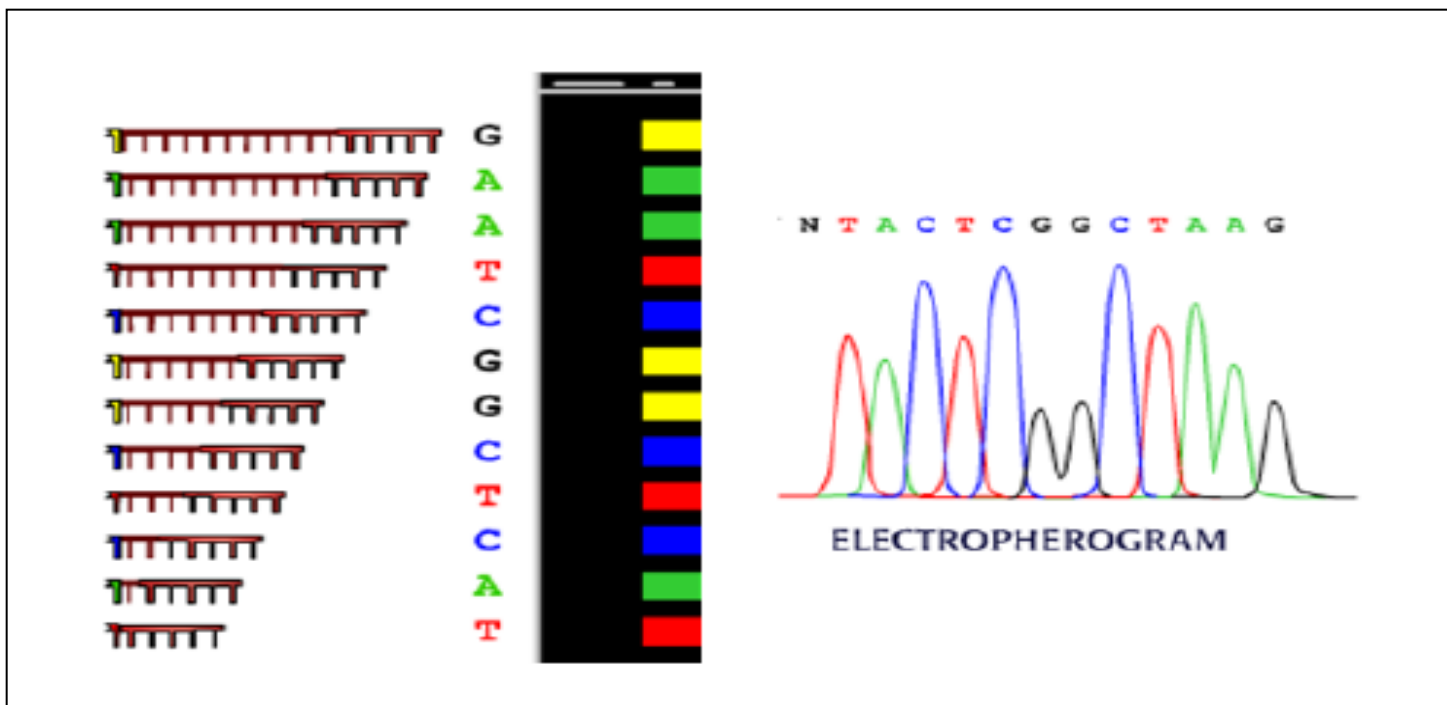






Método automático, fluorescente

- 1986- Método dideoxi automático



Cada marcador fluorescente pode ser detectado por seu espectro característico



NOVAS TECNOLOGIAS DE SEQÜENCIAMENTO



- As novas tecnologias de seqüenciamento, denominadas de tecnologias de seqüenciamento de nova geração, começaram a ser comercializadas em 2005 e estão evoluindo rapidamente
- Todas essas tecnologias promovem o seqüenciamento de DNA em plataformas capazes de gerar informação sobre milhões de pares de bases em uma única corrida com uma grande economia de tempo e custo por base para o seqüenciamento
- Dentre as novas plataformas de seqüenciamento, duas já possuem ampla utilização em todo o mundo: a plataforma 454 FLX da Roche e a Solexa da Illumina



Novas Tecnologias

	454	Solexa	SoliD	MegaBace (Sanger)
Sequencing chemistry	Pyrosequencing	Polymerase-based sequencing-by-synthesis	Ligation-based sequencing	
Amplification approach	Emulsion PCR	Bridge amplification	Emulsion PCR	
Paired ends/separation	Yes/3 kb	Yes/200 bp	Yes/3 kb	
Mb/run	100 Mb	1300 Mb	3000 Mb	0,07Mb
Time/run (paired ends)	7 h	4 days	5 days	2h
Read length	250 bp	32–40 bp	35 bp	700pb
Cost per run (total direct)	\$8439	\$8950	\$17 447	\$ 300
Cost per Mb	\$84.39	\$5.97	\$5.81	





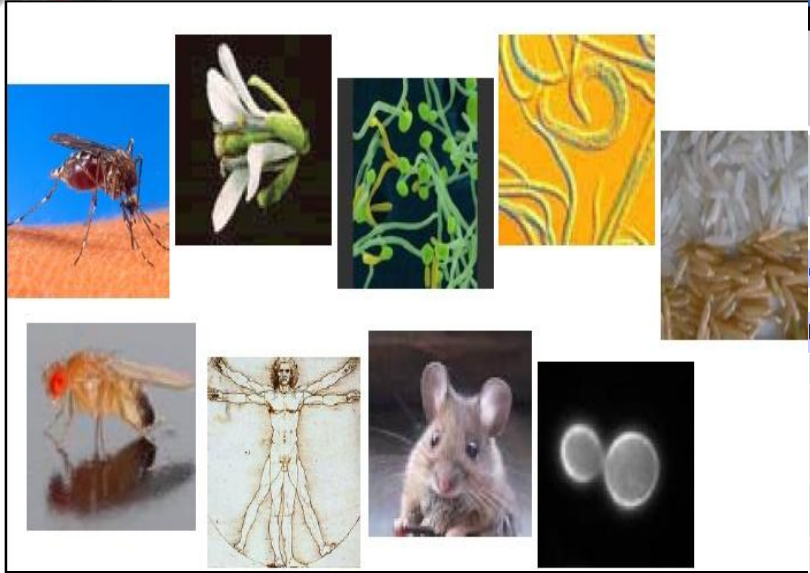
APLICAÇÕES DAS TÉCNICAS



Análise genômica

- O conhecimento da seqüência de bases de um gene fornece importantes informações sobre sua estrutura, função e relação evolutiva com outros genes (de um mesmo organismo ou de organismos diferentes)

GENOMAS NO MUNDO



NCBI **ENTREZ** Genome Project connection information discovery My NCBI [Sign In]

All Databases PubMed Nucleotide Protein Genome Structure OMIM PMC Journals Books

Search Genome Project for [] Go Clear

Limits Preview/Index History Clipboard Details

Display Overview Show 20 Send to

All: 1 Environmental: 0 Eukaryotes: 0 Prokaryotes: 1

Genome Project > *Bacillus subtilis* > *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* str. 168 project by BSNR

Resource Links

NCBI Resources

- FTP
- TaxPlot
- BLAST genome

Organism data in GenBank

- Genomic
- mRNA
- Protein
- WGS

Related Resources

- BGSC
- DBTBS

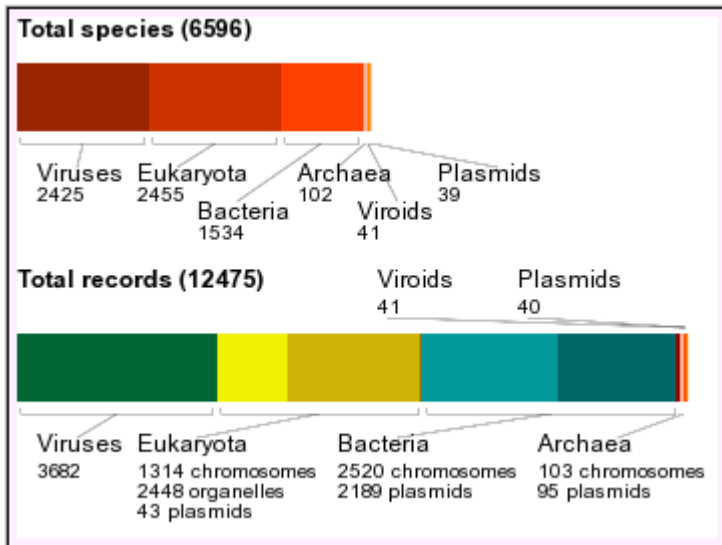
Model organism for prokaryotic cell differentiation and development. [Project data](#)

Lineage: *Bacteria*; *Firmicutes*; *Bacillales*; *Bacillaceae*; *Bacillus*; *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* str. 168

4215606 nt

Photo: Frederick C. Michel, ASM MicrobeLibrary

Genome Projects



- Total de espécies já sequenciadas - 6596 (NCBI- nov/2009):
1534 genomas bacterianos,
2455 eucariotos, 102 Archaea, 2425 genomas de vírus, 39 plasmídeos.

Search for

Display Show

All: 1 Environmental: 0 Eukaryotes: 1 Prokaryotes: 0

Genome Project > **Homo sapiens (human)**

Resource Links

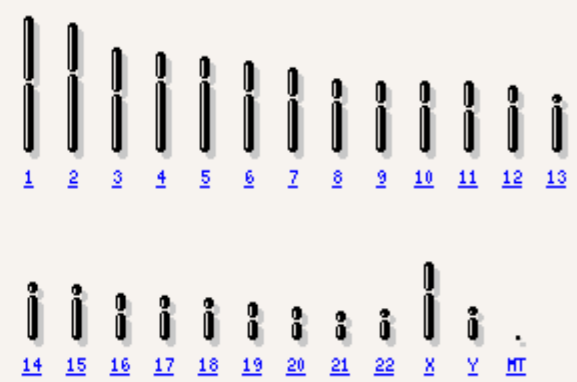
NCBI Resources

- [MapViewer](#)
- [BLAST genome](#)
- [GRC](#)
- [RefSeq](#)
- [Whole Genome Association \(WGA\)](#)
- [Human Genome Resources](#)
- [Consensus CoDing Sequence \(CCDS\)](#)
- [NCBI Handbook](#)
- [Trace Archive \(Venter\)](#)

Human genome projects have generated an unprecedented amount of knowledge about human genetics and health.

[Project data](#)

Lineage: *Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires Primates; Haplorrhini; Catarrhini; Hominidae; Homo sapiens*



Exemplos de organismos tiveram seu genoma seqüenciado

Complexidade de Genomas

	Tamanho	Seqüências Codificantes (%)	Número de genes
<i>Escherichia coli</i>	4,6 Mb	90	4288
<i>Chromoacterium violaceum</i>	4,7 Mb	90	4432
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	12 Mb	70	5885
<i>Caenorhabditis elegans</i>	98 Mb	25	19099
<i>Drosophila melanogster</i>	180 Mb	13	13600
<i>Arabidopsis thaliana</i>	125 Mb	10	12000
Genoma Humano	3200 Mb	3	100000

ATUALIZAR



GENOMAS NO BRASIL

Genoma
Xanthomonas citri

Genoma
Schistosoma mansoni

Genoma
Humano do Câncer

SUCEST
The Sugar Cane EST Project

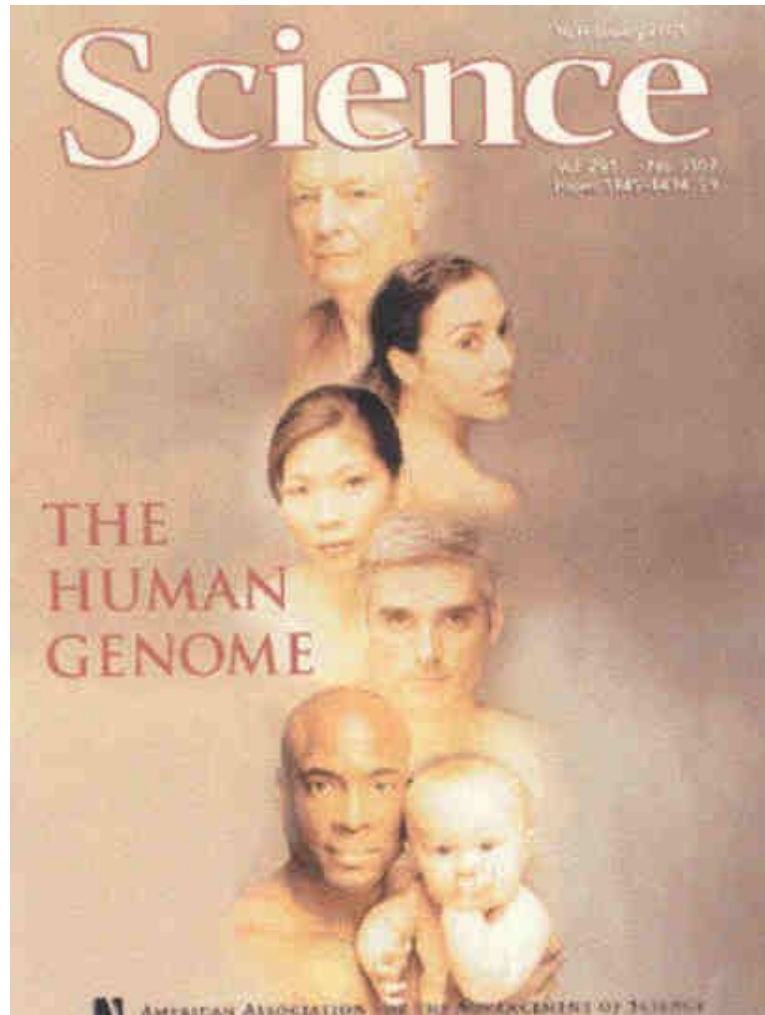
Genoma
Café

Agronomical & Environmental Genomes
AEG

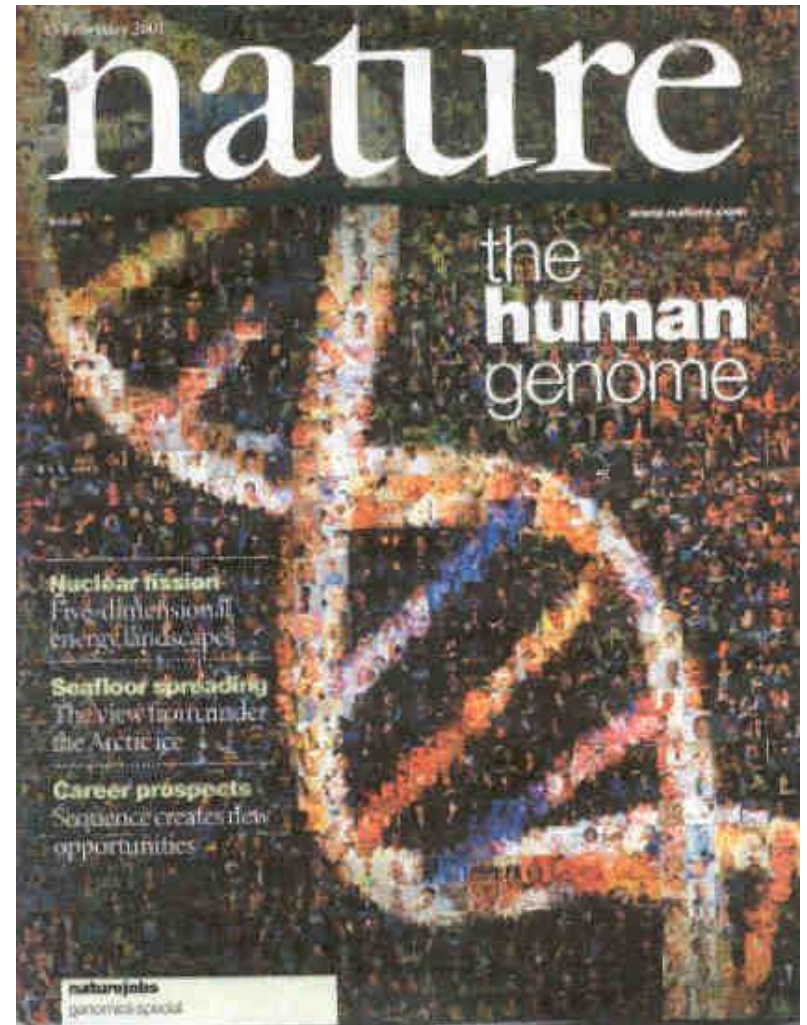


- Projeto genoma humano foi iniciado oficialmente em 1990
 - Direção do National Institutes of Health e U.S. Department of Energy – 18 países
 - 26 de junho de 2000 dois grupos Collins e Venter anunciaram a conclusão inicial do PGH
- Em 2003, foi determinada a ordem exata dos 3 bilhões de pares de bases que constituem o DNA dos 24 cromossomos

Venter et al.

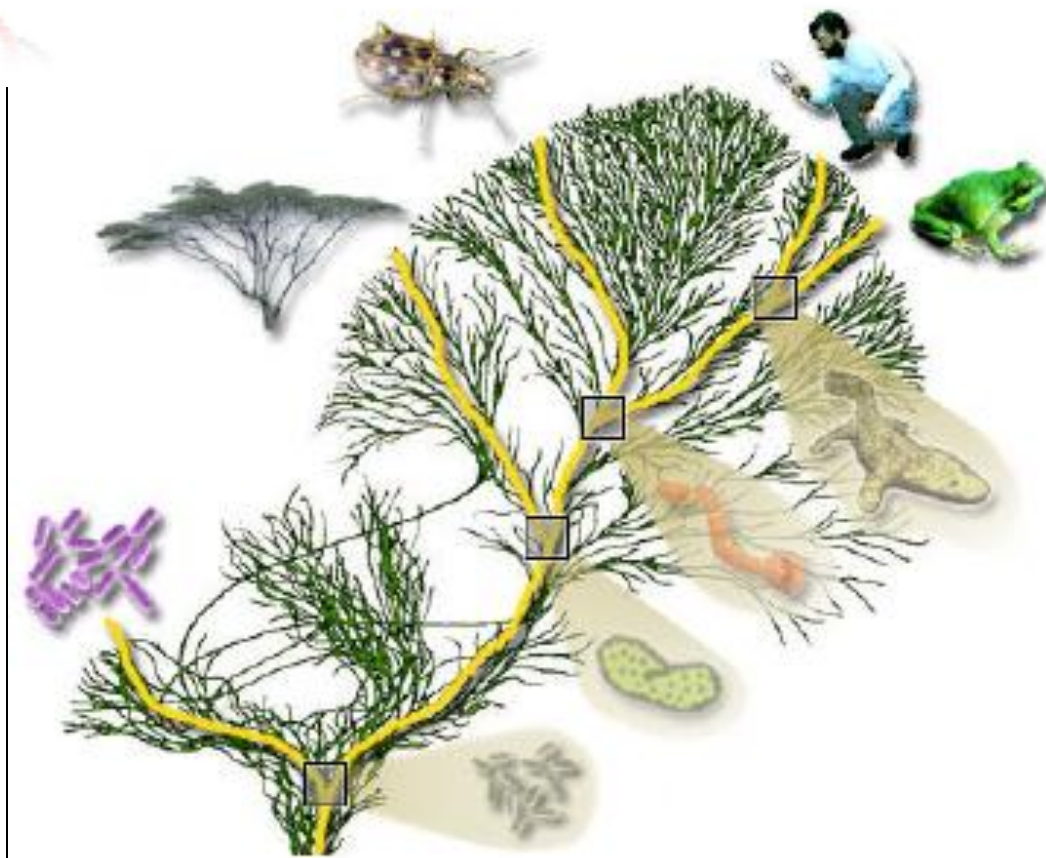


Colins et al.






Ciência forense



Análise filogenética

Relacionar organismos com base na similaridade de suas sequências



Identificação de genes envolvidos
no controle de doenças e do
estímulo à reprodução da espécie

Conservação de espécies



Epidemias virais

Identificação de espécies mutantes
de vírus, bactérias- resistência