



BIOLOGIE CELULARA SI MOLECULARA

LP11. Tehnici de secventiere



Biologie Celulara si Moleculara

Modul Biologie celulara:

Notiuni microscopie

Evaluare organite celulare;

Culturi de celule;

Modul Biologie moleculara:

Izolarea ADN și ARN;

Amplificarea ADN/ARN

Electroforeza

Tehnici de detectare a mutațiilor:

ASO.

RFLP.

DGGE.

Real-Time PCR.

Secvențiere.

ADN și ARN non-self.

Tehnici de detectie a mutatiilor. **Secventiere.**



Secvențiere

metoda de descoperire mutatii

Secvențierea ADN implică o serie de tehnici și metode utilizate pentru determinarea succesiunii nucleotidelor într-un fragment de ADN analizat. Procesul de secvențiere ADN identifică specific semnalul nucleotidic pe care îl convertește într-un format care poate fi descifrat de specialiști. Cartografierea secvenței de nucleotide a permis oamenilor de știință să înțeleagă mai bine genele și rolul lor în crearea corpului uman. Viteza rapidă de dezvoltare a tehnologiilor de secvențiere a ADN-ului au avut un rol esențial în descifrarea genomului uman (Human Genome Project). Proiecte similare, vizând ADN-ul diferitelor specii de animale, plante, precum cel al genomului microbial implică echipe de cercetători de pe toate continentele.



Secventiere

Metoda sinteza enzimatica
(Sanger)

primeri radiomarcati si analogi
dideoxinucleotide
dideoxinucleotide marcate
fluorescent

Pirosecventiere iterativa

Secventiere masiva paralela
cu ADN amplificat
fara ADN amplificat

- Metoda sinteza enzimatica (Sanger)
 - primeri radiomarcati si analogi dideoxinucleotide
 - dideoxinucleotide marcate fluorescent
- Pirosecventiere iterativa
- Secventiere masiva paralela
 - cu ADN amplificat
 - fara ADN amplificat

Secventiere

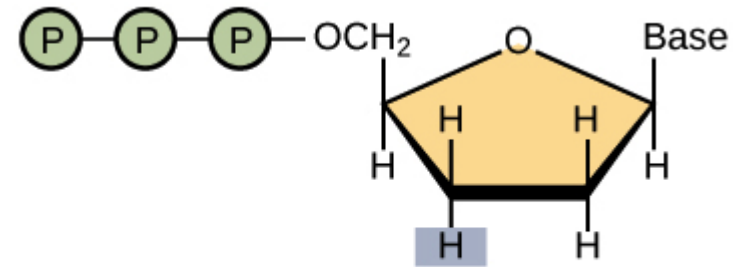
Metoda sinteza enzimatica (Sanger)

primeri radiomarcati si analogi
dideoxynucleotide
dideoxynucleotide marcate
fluorescent

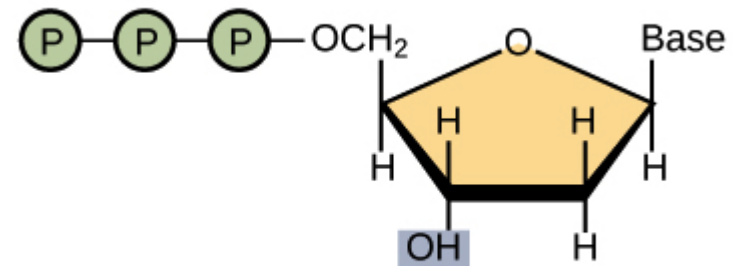
Pirosecventiere iterativa

Secventiere masiva paralela

cu ADN amplificat
fara ADN amplificat



Dideoxynucleotide (ddNTP)



Deoxynucleotide (dNTP)

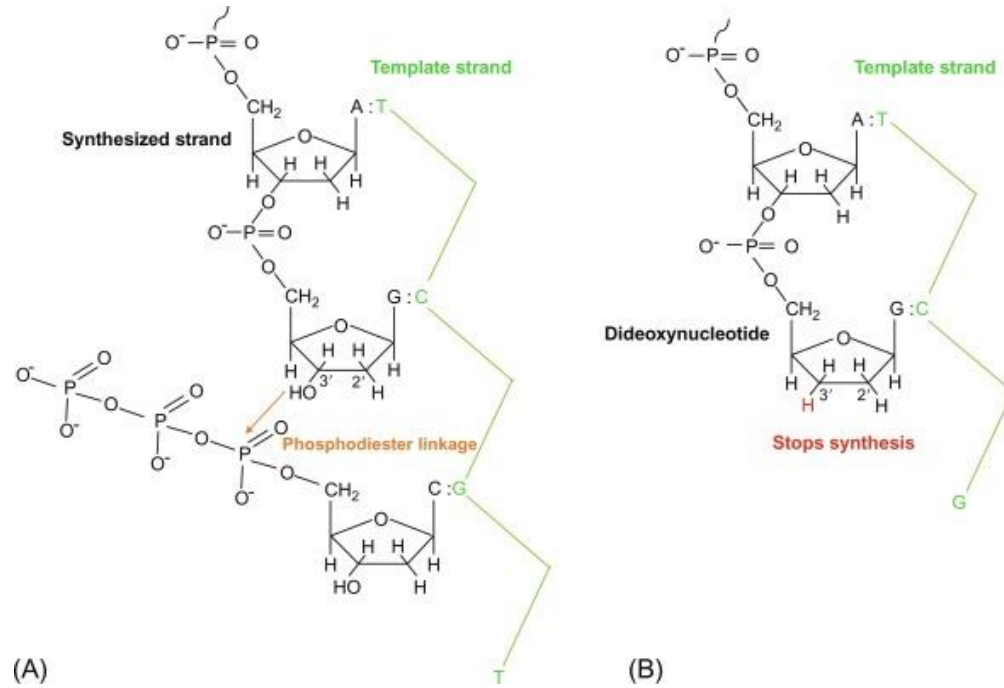
Secventiere

Metoda sinteza enzimatica (Sanger)

primeri radiomarcati si analogi
 dideoxinucleotide
 dideoxinucleotide marcate
 fluorescent

Pirosecventiere iterativa

Secventiere masiva paralela
 cu ADN amplificat
 fara ADN amplificat





Secventiere

Metoda sinteza enzimatica
(Sanger)

primeri radiomarcati si analogi
dideoxynucleotide

dideoxynucleotide marcate
fluorescent

Pirosecventiere iterativa

Secventiere masiva paralela

cu ADN amplificat

fara ADN amplificat

Steps

- **1. DNA Sequence For Chain Termination PCR**
- **2. Size Separation by Gel Electrophoresis**
- **3. Gel Analysis & Determination of DNA Sequence**



Secventiere

Metoda sinteza enzimatica
(Sanger)

primeri raiomarcati si analogi
dideoxynucleotide
dideoxynucleotide marcate
fluorescent

Pirosecventiere iterativa

Secventiere masiva paralela
cu ADN amplificat
fara ADN amplificat

- **1. DNA Sequence For Chain Termination PCR**
 - **mix PCR – main components**

I.amplification PCR

DNA
polymerase
FWD primer
REV primer
dNTPs (A,C,T,G)

II.sequencing PCR

amplicons I amp PCR
polymerase
only one of the
FWD or REV primers /tube
dNTPs (A,C,T,G)
ddNTPs *(ddA, ddC, ddT, ddG)

Secventiere

Metoda sinteza enzimatica (Sanger)

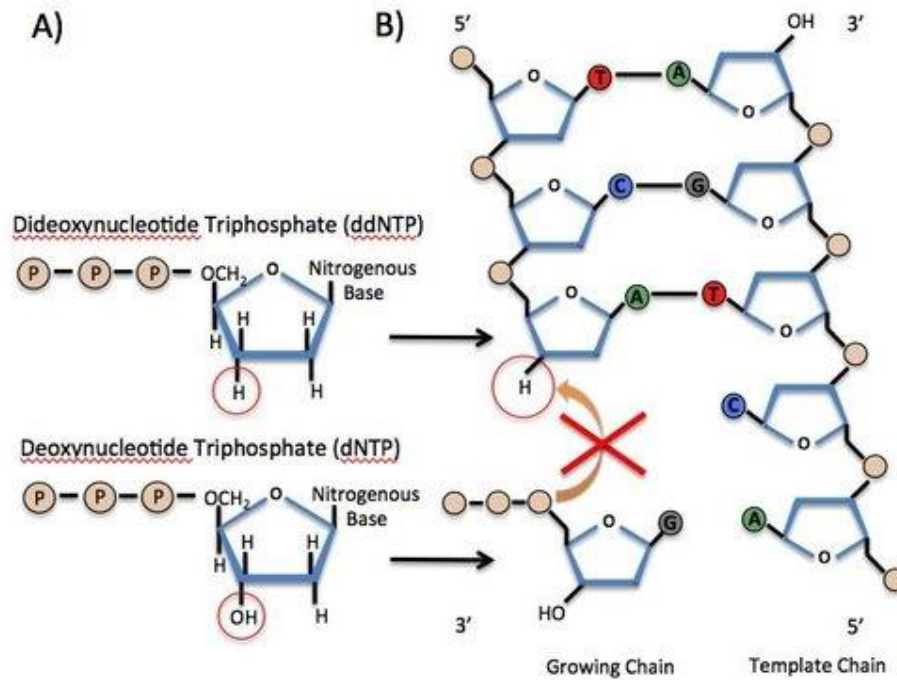
primeri radiomarcati si analogi
dideoxynucleotide

dideoxynucleotide marcate
fluorescent

Pirosecventiere iterativa

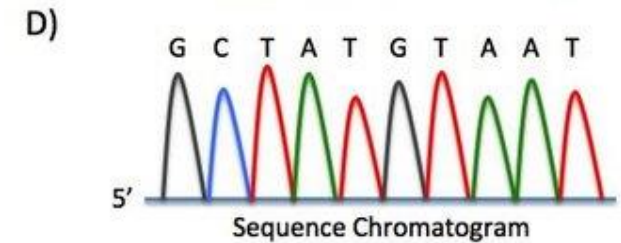
Secventiere masiva paralela

cu ADN amplificat
fara ADN amplificat



C) **Template Sequence**
3' GAGCAAATTCGATACATTATTGT... 5'
Primer
5' CTCGTTTAAG... 3'

CTCGTTTAAGG — G
CTCGTTTAAGGC — C
CTCGTTTAAGGGT — T
CTCGTTTAAGGGTA — A
CTCGTTTAAGGGTAT — T
CTCGTTTAAGGGTATG — G
CTCGTTTAAGGGTATGT — T
CTCGTTTAAGGGTATGTA — A
CTCGTTTAAGGGTATGTAA — A
CTCGTTTAAGGGTATGTAAT — T



Secventiere

Metoda sinteza enzimatica
(Sanger)

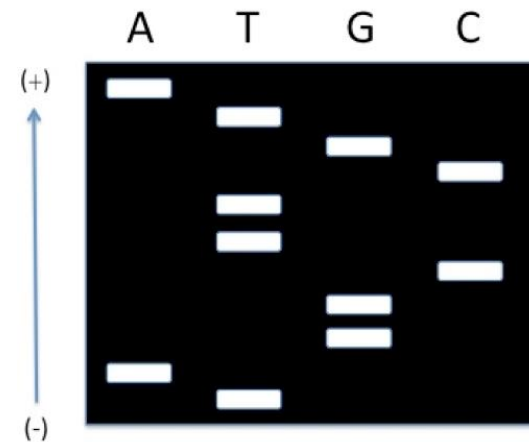
primeri radiomarcati si analogi
dideoxinucleotide
dideoxinucleotide marcate
fluorescent

Pirosecventiere iterativa

Secventiere masiva paralela
cu ADN amplificat
fara ADN amplificat

• 2. Size Separation by Gel Electrophoresis

(1)



(2)



Secventiere

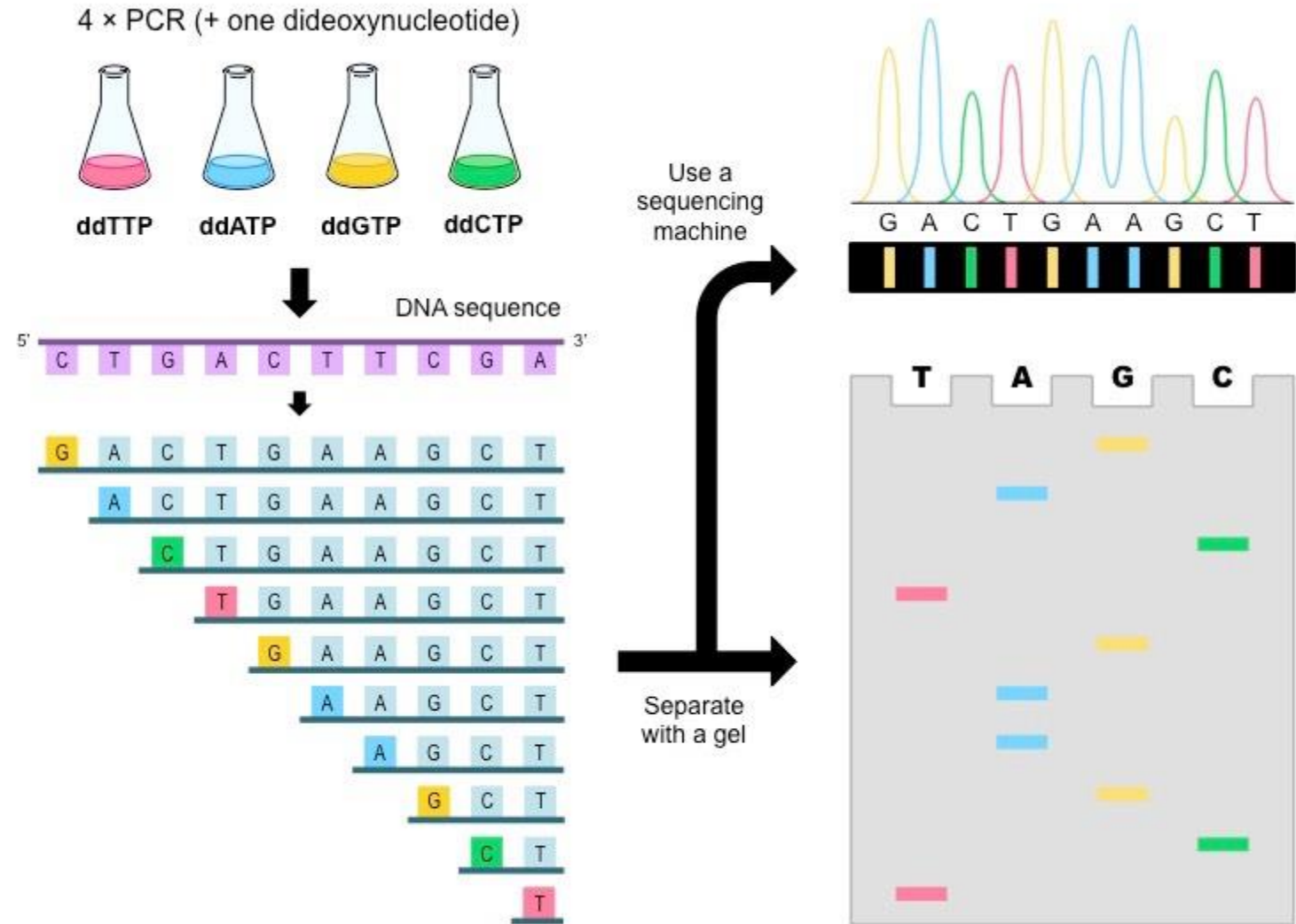
Metoda sinteza enzimatica (Sanger)

primeri raiomarcati si analogi dideoxynucleotide
 dideoxynucleotide marcate fluorescent

Pirosecventiere iterativa

Secventiere masiva paralela

cu ADN amplificat
 fara ADN amplificat



Secventiere

Metoda sinteza enzimatica (Sanger)

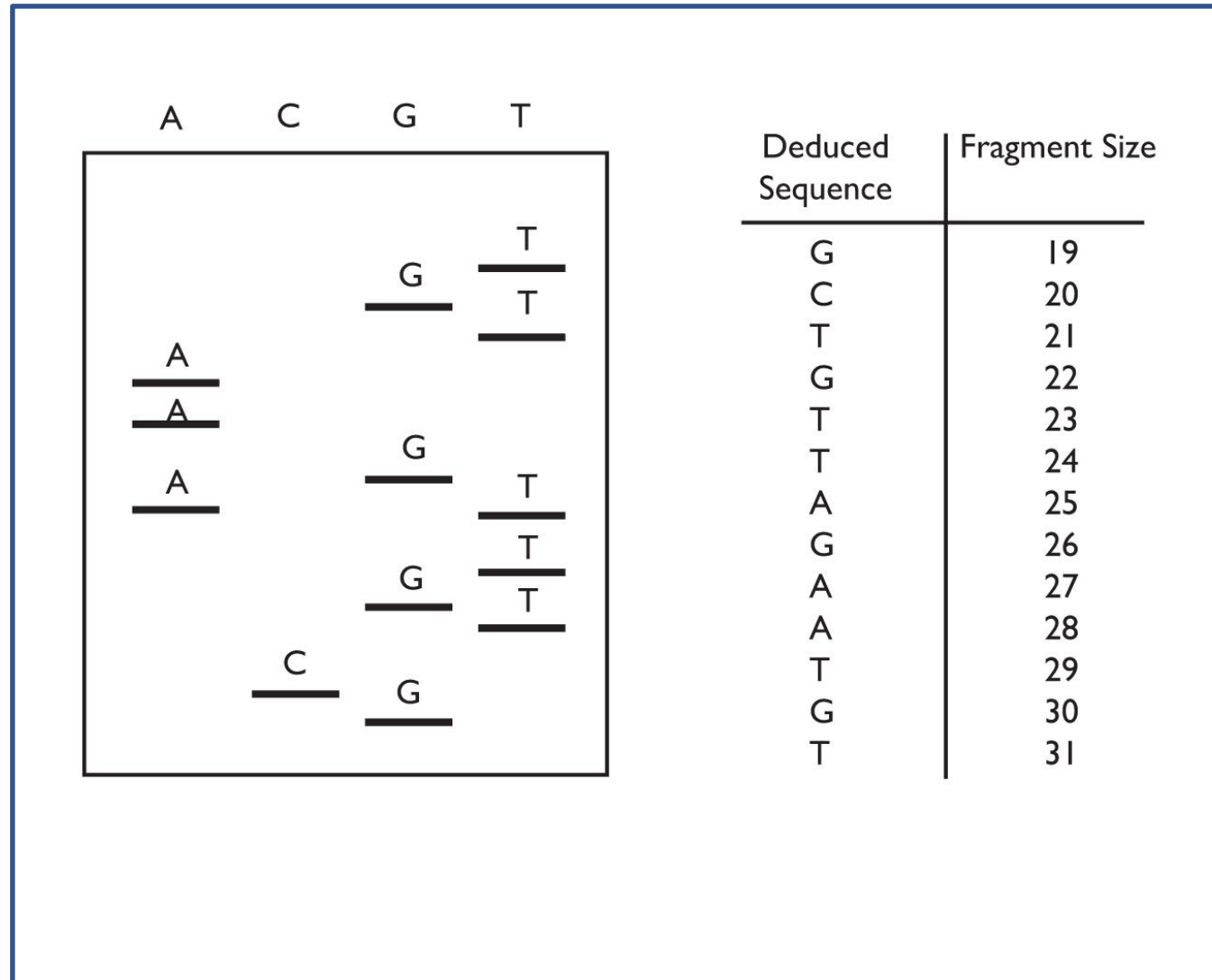
primeri radiomarcati si analogi
dideoxynucleotide

dideoxynucleotide marcate
fluorescent

Pirosecventiere iterativa

Secventiere masiva paralela

cu ADN amplificat
fara ADN amplificat



Secventiere

Metoda sinteza enzimatica (Sanger)

primeri radiomarcati si analogi
dideoxinucleotide

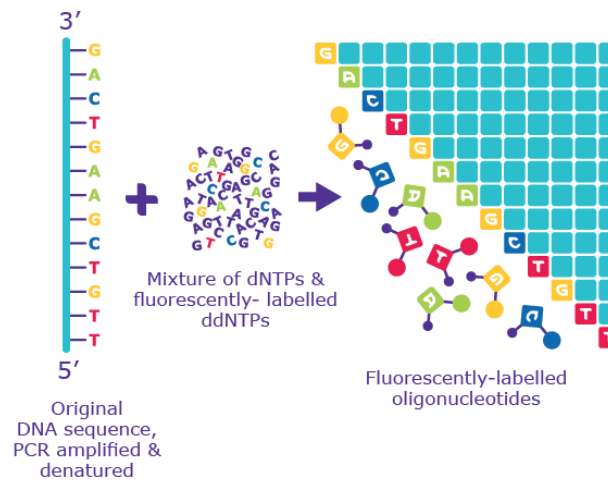
dideoxinucleotide marcate
fluorescent

Pirosecventiere iterativa

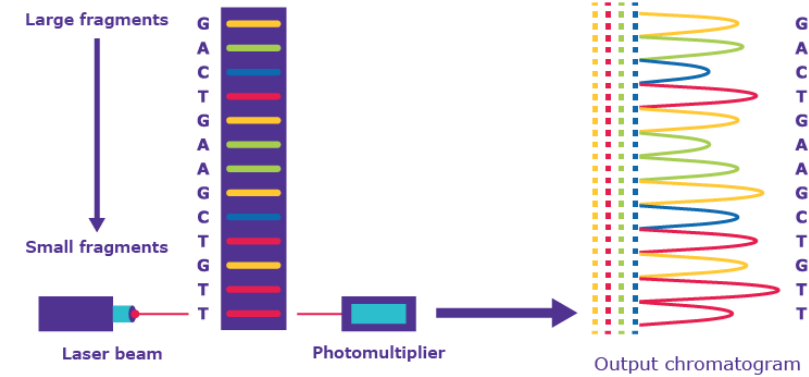
Secventiere masiva paralela

cu ADN amplificat
fara ADN amplificat

1 PCR with fluorescent, chain-terminating ddNTPs



2 Size separation by capillary gel electrophoresis



3 Laser excitation & detection by sequencing machine

Secventiere

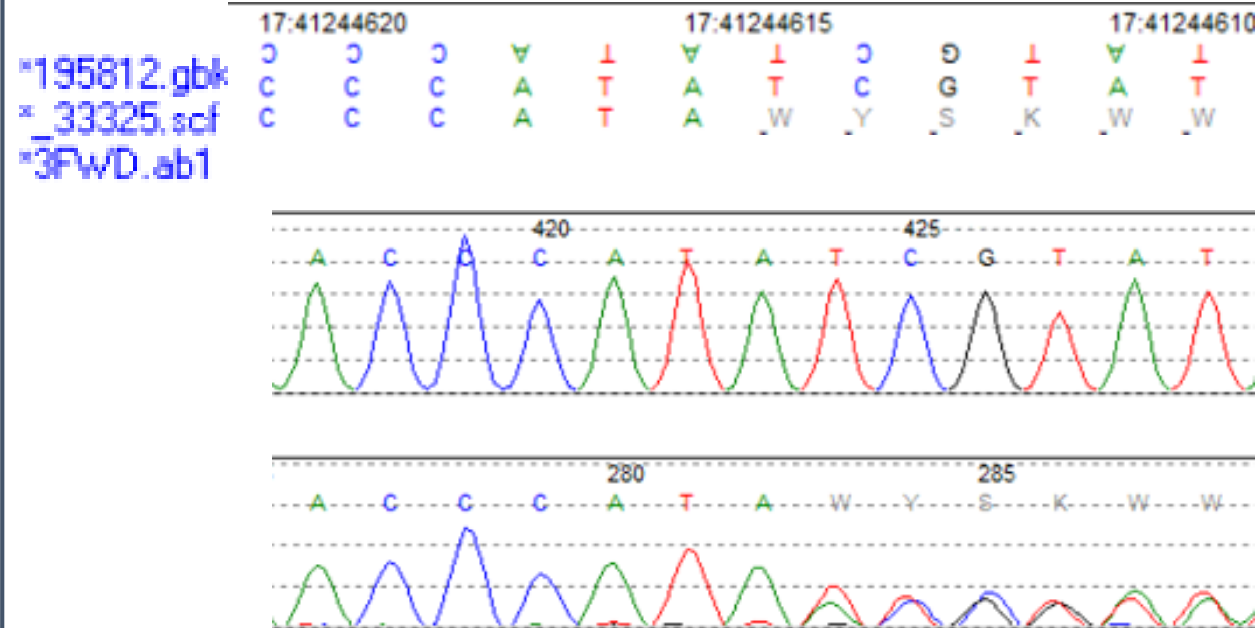
Metoda sinteza enzimatica (Sanger)

- primeri radiomarcati si analogi dideoxinucleotide
- dideoxinucleotide marcate fluorescent

Pirosecventiere iterativa

- Secventiere masiva paralela
- cu ADN amplificat
- fara ADN amplificat

• 3. Gel Analysis & Determination of DNA Sequence



Secventiere

Metoda sinteza enzimatica (Sanger)

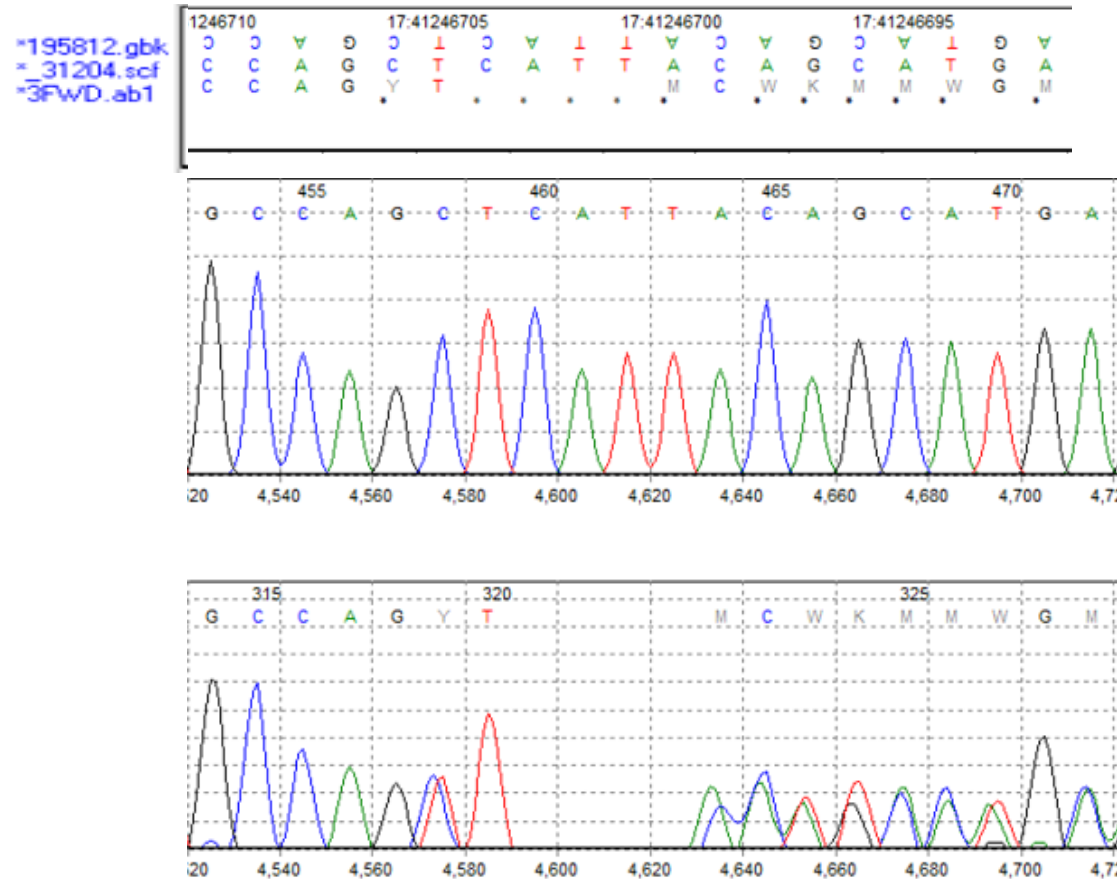
- primeri radiomarcati si analogi dideoxinucleotide
- dideoxinucleotide marcate fluorescent

Pirosecventiere iterativa

Secventiere masiva paralela

- cu ADN amplificat
- fara ADN amplificat

• 3. Gel Analysis & Determination of DNA Sequence





Secventiere

Metoda sinteza enzimatica (Sanger)

primeri radiomarcati si analogi
dideoxynucleotide
dideoxynucleotide marcate
fluorescent

Pirosecventiere iterativa

Secventiere masiva paralela

cu ADN amplificat
fara ADN amplificat





Secventiere

Metoda sinteza enzimatica (Sanger)

primeri radiomarcati si analogi
dideoxynucleotide
dideoxynucleotide marcate
fluorescent

Pirosecventiere iterativa

Secventiere masiva paralela

cu ADN amplificat
fara ADN amplificat

DNA Sequencing



Secventiere

Metoda sinteza enzimatica (Sanger)

primeri radiomarcati si analogi
dideoxinucleotide
dideoxinucleotide marcate
fluorescent

Pirosecventiere iterativa

Secventiere masiva paralela
cu ADN amplificat
fara ADN amplificat

1. Adiția unuia dintre cele 4 tipuri de dNTPs (cu o singură modificare: dATP este înlocuit cu *dATPaS* ce nu este substrat pentru luciferază) inițiază pasul 2. În momentul incorporării corecte a unui dNTP de către ADN polimerază este eliberat un pirofosfat (PPi).
2. ATP sulfurilaza convertește PPi în ATP în prezența Adenozin 5' fosfosulfat. ATP-ul este utilizat de către luciferază pentru convertirea luciferinei în oxiluciferină. Acest proces este dependent de cantitatea de ATP prezentă. Semnalul luminos este detectat de camera CCD.
3. Nucleotidele neîncorporate sunt degradate de către apirază, reacția reîncepând cu un alt nucleotid.

Secventiere

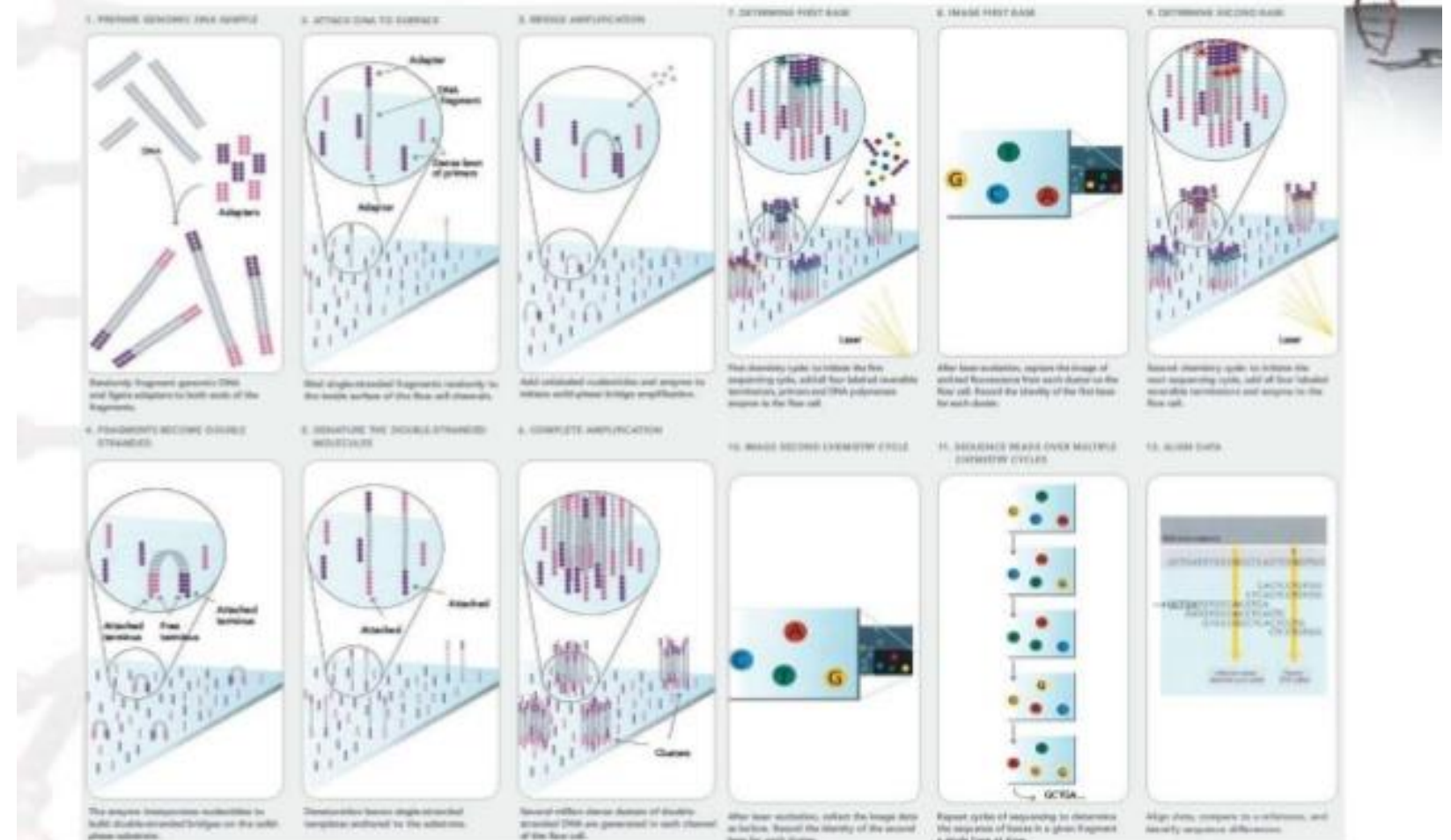
Metoda sinteza enzimatica
(Sanger)

- primeri radiomarcati si analogi dideoxinucleotide
- dideoxinucleotide marcate fluorescent

Pirosecventiere iterativa

Secventiere masiva paralela
cu ADN amplificat
fara ADN amplificat

Illumina Diagram



Secventiere

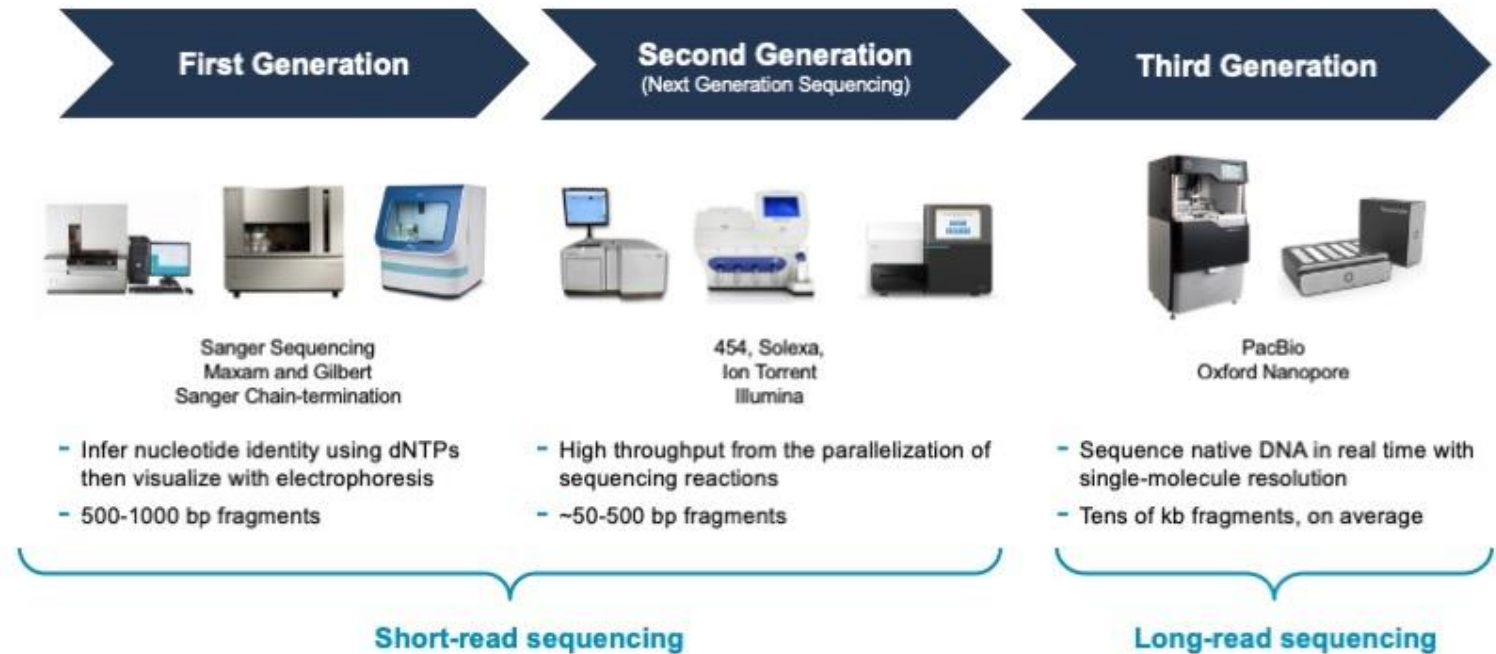
Metoda sinteza enzimatica (Sanger)

primeri radiomarcati si analogi
dideoxinucleotide
dideoxinucleotide marcate
fluorescent

Pirosecventiere iterativa

Secventiere masiva paralela

cu ADN amplificat
fara ADN amplificat





DISCUȚII

