

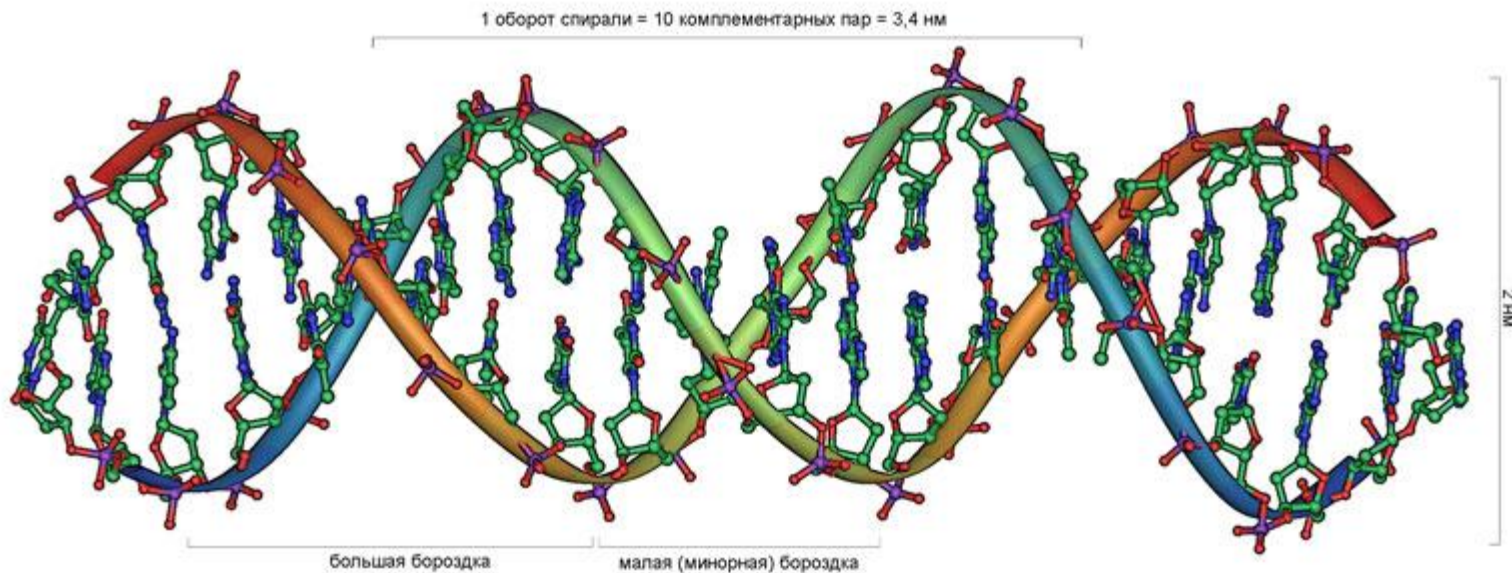


# Секвенирование

---

Литвинов Я.В. ЭКП-1-2018-НМ





Начнем с того, как выглядит молекула ДНК. Молекулы полимеров характеризуются первичной структурой, под которой понимается просто состав молекулы (в данном случае – последовательность букв А, С, G и Т, которые и составляют геном), вторичной структурой, т.е. тем, какие именно химические связи устанавливаются между этими компонентами и какие в результате получаются базовые пространственные структуры (в данном случае – двойная спираль), и третичной структурой, т.е. тем, как вторичная структура «уложена» в пространстве. Вторичная структура ДНК представляет собой двойную спираль, состоящую из четырёх разных нуклеотидов.



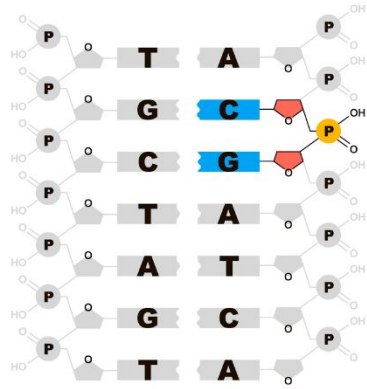
Азотистое основание



Деоксирибоза



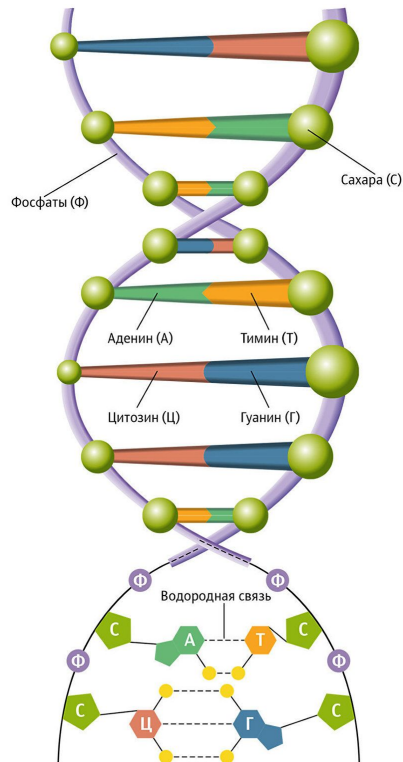
Остаток фосфорной кислоты



Нуклеотиды обозначаются по содержащимся в них азотистым основаниям: аденину (А), цитозину (С), гуанину (G) и тимину (Т) (есть ещё урацил, который в РНК заменяет тимин).

ATGCAGAACAGACGATCAGCGACACTTTA  
TACGTCTTGTCTGCTAGTCGCTGTGAAAT

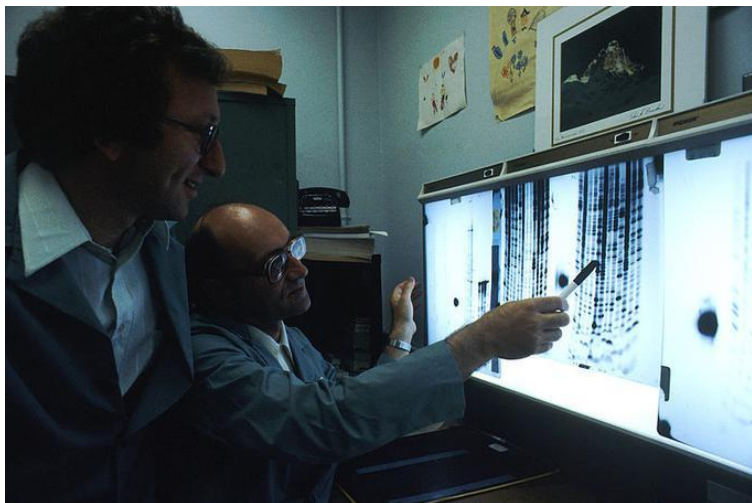
Важно понять, что ДНК – это две копии одного и того же «текста» из четырёх «букв»; «буквы» в копиях не идентичны, но однозначно соответствуют друг другу.



Было бы, конечно, удобно, если бы нам удалось аккуратно «вытянуть» одну нить ДНК и спокойно, нуклеотид за нуклеотидом, «прочитать» эту нить от начала до конца. При таком, идеальном, методе секвенирования (чтения ДНК) никаких хитрых алгоритмов не понадобилось бы. К сожалению, на данном этапе такое невозможно, и приходится довольствоваться результатами того секвенирования, которое есть.



# Определение



- Секвенирование биополимеров (белков и нуклеиновых кислот — ДНК и РНК) — определение их аминокислотной или нуклеотидной последовательности (от лат. sequentum — последовательность). В результате секвенирования получают формальное описание первичной структуры линейной макромолекулы в виде последовательности мономеров в текстовом виде.
- Секвенирование (от англ. sequence — «последовательность») — это общее название методов, которые позволяют установить последовательность нуклеотидов в молекуле ДНК.



# Существуют два основных метода секвенирования ДНК: химический и ферментативный.

- Химический метод, или метод химической дегградации по Максаму — Гилберту, был разработан в 1976 году Алланом Максимом и Уолтером Гилбертом. В основе метода лежит расщепление меченых участков ДНК под химическим воздействием. Мечение идет только по одному концу (3' или 5'). Концентрация и длительность воздействия реагента подбираются так, что модифицируются нуклеотиды только одного типа (Ц; Ц+Г; Г; Г+А). Разделение по меченым участкам происходит с помощью электрофореза в агарозном геле.
- Ферментативный метод (также метод обрыва цепи или дидезоксисеквенирование) был разработан Фредериком Сэнгером в 1977 году. Суть заключается в синтезе изучаемой цепи ДНК с остановкой синтеза на заданном основании путем присоединения дидезоксинуклеотида. Идет в несколько этапов:
  1. Гибридизация участка ДНК с праймером — искусственно созданной последовательностью, комплементарной некоторому участку исходной ДНК;
  2. Ферментативный синтез ДНК;
  3. Денатурация, в результате которой образуются олигонуклеотидные последовательности разной длины, содержащие праймер;
  4. Электрофорез в полиакриламидном геле.





# Современные методы

- Последние 20 лет доминирует автоматизированное секвенирование по методу Сэнгера. Развитие секвенирования в медицине начало эру персональной медицины, учитывающей индивидуальные различия пациентов и позволяющей улучшить качество медицинской помощи.
- В настоящее время также существуют так называемые методы секвенирования ДНК нового поколения. Все подобные технологии основываются на секвенировании ДНК-чипов во время интерактивных циклических ферментативных реакций с дальнейшим сбором полученной информации в виде иллюстраций. С помощью полученных данных и восстанавливается последовательность ДНК. Преимущество этих методов заключается в том, что они могут одновременно читать несколько участков ДНК.



Геном человека было отсеквенирован в 2002 году. Это заняло 13-15 лет у всего научного сообщества.

Около 12 лет назад технологии секвенирования были усовершенствованы физиками и химиками. Раньше секвенировали с одного конца и это было долго и дорого. Сейчас секвенирование идет небольшими участками, но параллельно. ДНК фрагментируют на небольшие читаемые участки. Получают набор последовательностей, которые обрабатывает компьютер.

Основные задачи:

- Рутинные – биотехнологические – подтверждение последовательностей и подобные
- Научные – поиск новых геномов, развитие геномики
- Медицинские – медицинская генетика – диагностика изменения последовательностей и их последствия



# Будущее за микробиологией

