

Sekvenování – klasická metodika

Monika Šedivcová¹, Petr Martínek¹, Jan Stehlík¹, Petr Grossmann¹,
Jana Kašpírková^{1,2}, Tomáš Vaněček^{1,2}

¹ Bioptická laboratoř, s.r.o., Plzeň

² Šiklův ústav patologie LF UK a FN, Plzeň

SOUHRN

V krátkém přehledu je pojednáno o základních metodách čtení pořadí jednotlivých bází v molekule DNA. Podrobněji je popsáno tzv. Sangerovo sekvenování, které je v současnosti zdaleka nejrozšířenější klasickou metodou. Detailně je osvětlen princip určení pořadí bází pomocí tvorby fragmentů se známou koncovou bází prostřednictvím terminační syntézy DNA a možnosti separace a detekce získaných produktů. Krátce jsou též zmíněny některé alternativní metodiky. Dále je vysvětlen postup při analýze získaných sekvenčních dat, možné výstupy z těchto dat a také omezení a možná úskalí Sangerovy sekvenční analýzy.

Klíčová slova: sekvenování – Sanger – syntéza – ddNTP – fluorescence – kapilární elektroforéza – mutace – sekvenogram

Sequencing – classical method

SUMMARY

In this article the basic methods of reading nucleotide sequences in DNA molecules are summarized. Sanger sequencing is described most thoroughly as it is the most frequent routine method currently being utilized. The article describes in detail the principle of sequence determination through the production of fragments with a known end base using chain termination synthesis of DNA and ways of separation and detection of the fragments. Some alternative methods of sequencing are mentioned in short. Basic approaches of analyzing sequence data are explained as well as different outcomes, obstacles and challenges.

Key words: sequencing – Sanger – synthesis – ddNTP – fluorescence – capillary electrophoresis – mutation – electropherogram

Cesk Patol 2013; 49(3): 122–128

Sekvenování je metoda molekulární biologie, která slouží k určení přesného pořadí bází, tedy adeninu (A), cytosinu (C), guaninu (G) a thyminu (T) v řetězci DNA. Využívá se jak k určení pořadí bází v dosud neznámých genech, chromozomech či genomech (v roce 2001 bylo např. úspěšně dokončeno sekvenování celého lidského genomu (1)), tak k detekci odchylek, tedy mutací či polymorfizmů, od již známé sekvence. Toto takzvané resekvenování slouží k odhalení *substitucí* (báze nahrazena jinou), *delecí* (ztráta bází), *inzerce* (vlození bází) nebo *duplikací* (zdvojení bází) v genech, které hrají důležitou úlohu v řadě dědičných i sporadických onemocnění člověka. Sekvenování tak představuje užitečný nástroj patologické diagnostiky.

Počátky sekvenování, ve smyslu jak o něm hovoříme nyní, se datují do poloviny 70. let, kdy byly vyvinuty a publikovány dvě různé sekvenční metody – Sangerova (označována také jako „dideoxymetoda“) a Maxam-Gilbertova (2,3), obě využívající elektroforetické separace různě dlouhých fragmentů DNA se známou koncovou bází. Zejména z technických důvodů však časem zcela převládla metoda Sangerova, která je nyní využívána ve všech oblastech molekulární biologie.

✉ Adresa pro korespondenci:

Ing. Monika Šedivcová
Bioptická laboratoř s.r.o.
Mikulášské nám. 4, 326 00 Plzeň
e-mail: sedivcova@medima.cz

PRINCIP SANGEROVY METODY

Principem Sangerovy metody je terminace syntézy nových DNA řetězců prostřednictvím náhodné inkorporace modifikovaných nukleotidů, tzv. **dideoxynukleotidů** (ddNTPs), separace těchto řetězců a jejich vizualizace.

Nejprve je zkoumaný úsek DNA namnožen na vysoký počet kopií (řádově miliardy z jedné molekuly). Tato amplifikace probíhá *in vitro* za použití polymerázové řetězové reakce (PCR), popř. příbuzných metod, či *in vivo* pomocí klonování a replikace v laboratorním mikroorganismu.

Vlastní sekvenční reakce obsahuje několik komponent. První z nich je namnožená *templátová DNA*. Původně byla používána výhradně jednořetězcová DNA, s postupem času však byly vypracovány protokoly umožňující analyzovat jednořetězcovou DNA připravenou z dvouřetězcové přímo v sekvenční reakci. Další složkou je replikační enzym *DNA polymeráza*, který syntetizuje komplementární vláknice k sekvenované DNA. Syntéza probíhá obdobně jako při replikaci ve směru 5'→3'. K syntéze využívá DNA polymeráza tzv. *primer*, což je zhruba 20 bází dlouhý syntetický oligonukleotid komplementární ke konkrétní části templátu, a také jednotlivé deoxynukleotidy (dNTPs), které začleňuje na základě principu komplementarity bází do nově vznikajícího řetězce. V původním Sangerově provedení s radioaktivně značeným dATP (značení prostřednictvím ³²P) je výše zmíněná reakční směs rozdělena do čtyř zkumavek označených G, A, T, C a do každé z nich je přidán i příslušný ddNTP a to v koncentraci řádově nižší (specificky dle konkrétní použité DNA polymerázy), než je koncentrace ostatních dNTP. Do zkumavky označené G je tedy přidán ddGTP, do zkumavky A je přidán ddATP atd. Tyto ddNTP se bě-