

DNA-Sequenzierung

- Grundlagen und Methoden der ersten Generation
(Maxam u. Gilbert; Sanger)
- Grundlagen und Methoden der zweiten Generation
(Pyrosequencing/454; Illumina/Solexa; ABI,SOLID, nanopore sequencing)

„Even the smallest functional DNA varieties seen, those occurring in small phages, must have something like 5000 nucleotides in a row. We may, therefore, leave the task of reading the complete nucleotide sequence of a DNA for the next century, which will, however, have other worries.“

Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology, 1968

Methoden der DNA-Sequenzierung

1977

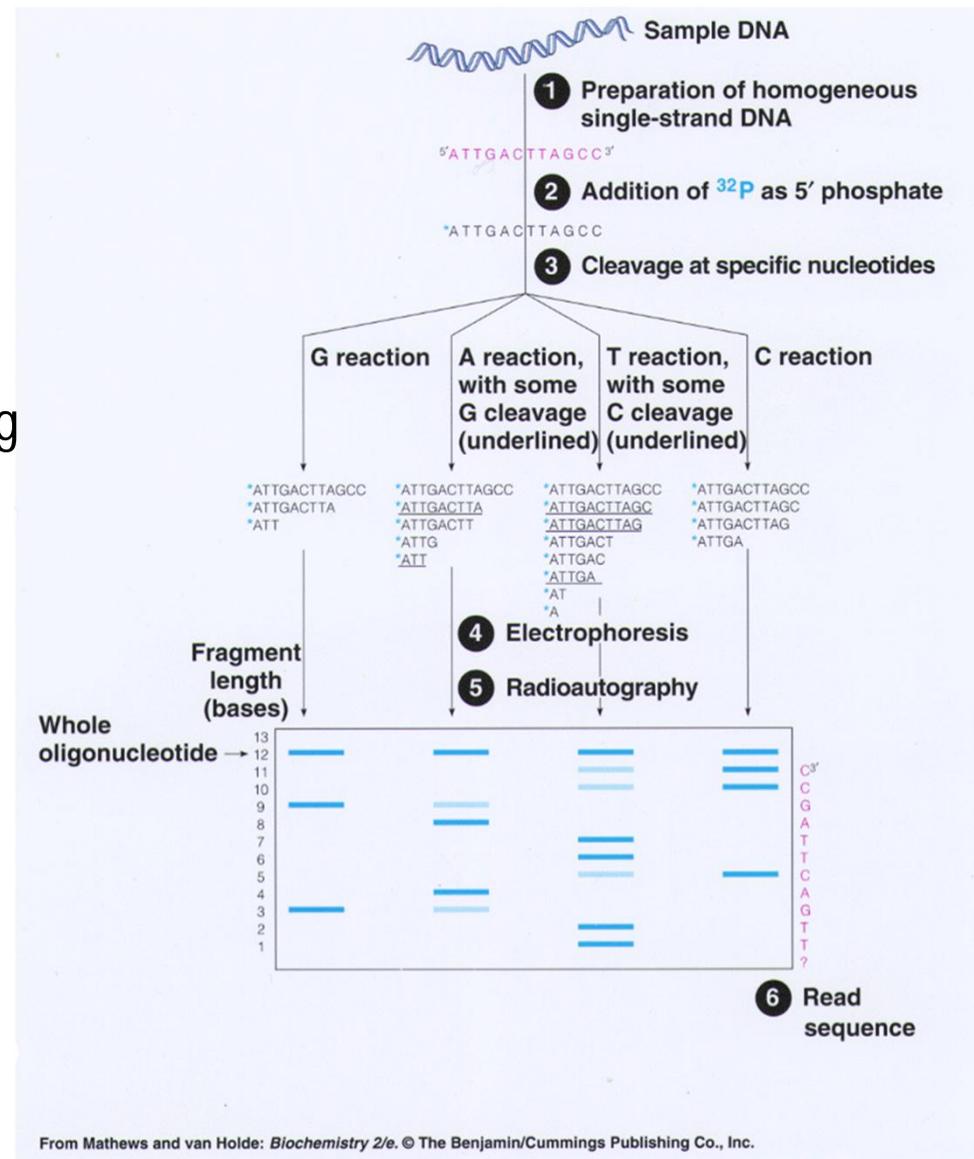
- chemische Sequenzierung (Maxam u. Gilbert)
- enzymatische Sequenzierung (Sanger, Nicklen, Coulson)

synonym: > Kettenabbruch-Sequenzierung
> Didesoxy-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung nach Maxam u. Gilbert

- basenspezifische Spaltung von ssDNA
- elektrophoretische Auftrennung der entstandenen Fragmente

Base specificity	Chemical used for base alteration
G	Dimethylsulphate
A+G	Acid
C+T	Hydrazine
C	Hydrazine + alkali
A>C	Alkali

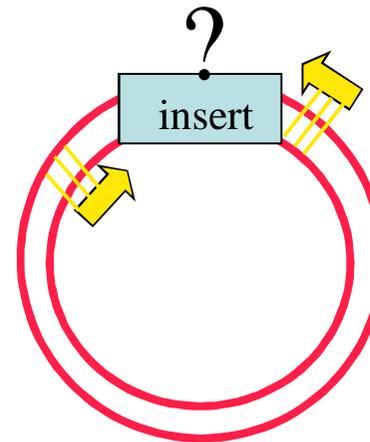


Die DNA-Sequenzierung nach Sanger et al.

- die Reaktion ist eine *in vitro*-Replikation
d.h. sie erfordert: eine DNA-Polymerase,
dNTPs
einen Primer (freies 3'OH)!
- der zu sequenzierende, unbekannte DNA-Bereich muss von einem bekannten Bereich (= Primer-Bindestelle) flankiert werden
- die Matrize muss vor Beginn der Reaktion denaturiert werden

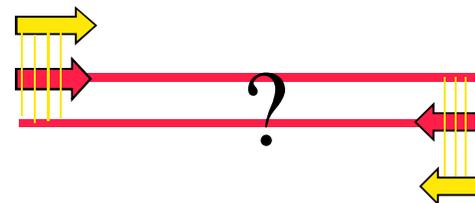
Sowohl klonierte DNA als auch PCR-amplifizierte DNA können so sequenziert werden...

Plasmid-DNA



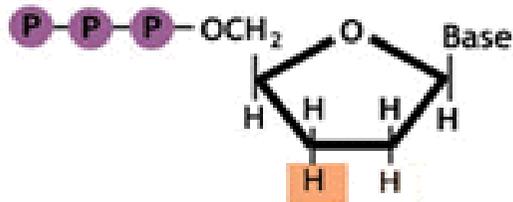
Primer 1
oder
Primer2

PCR-Amplifikat

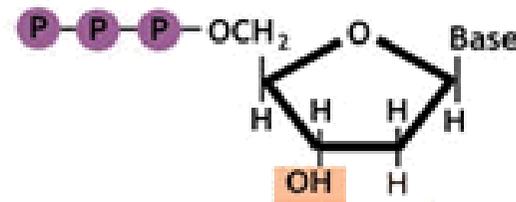


Primer 1
oder
Primer2

Der entscheidende (Nobelpreis-trächtige) Trick der Sanger-Sequenzierung...



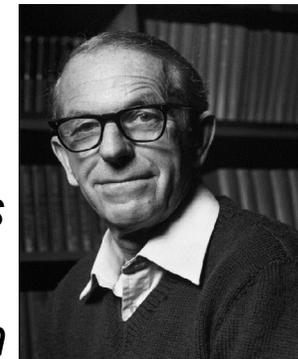
dideoxynucleotide (ddNTP)



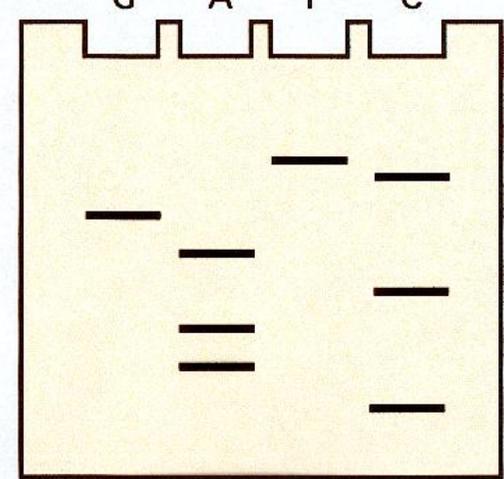
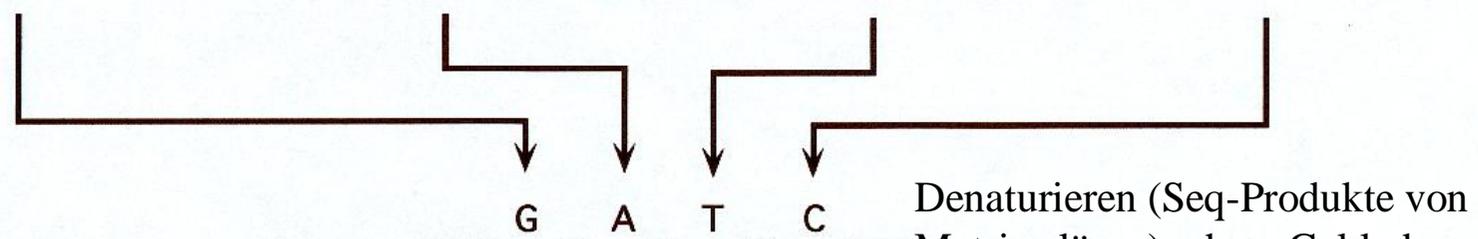
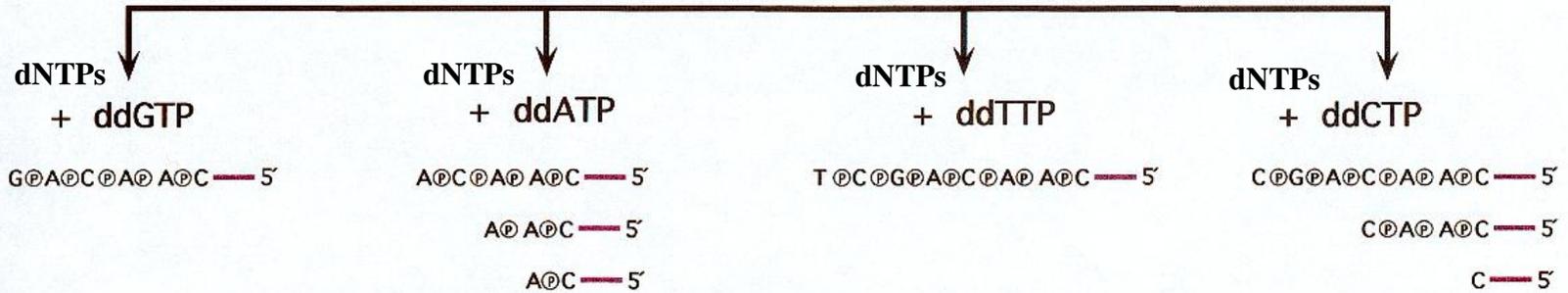
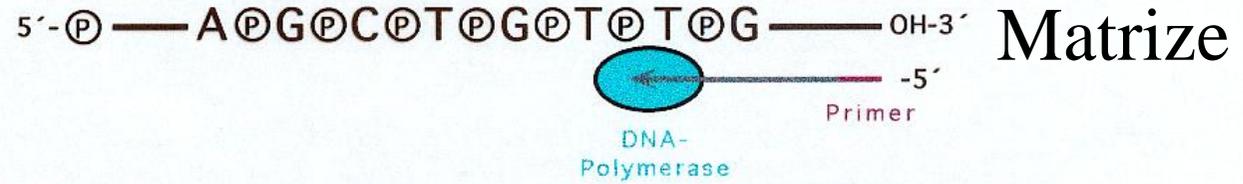
deoxynucleotide (dNTP)

2'-3'-Dideoxy-Nukleotide machen bei Einbau einen Kettenabbruch!

Frederick Sanger. 1918
1980 Nobel Prize in Chemistry
determination of base sequences in nucleic acids
1958 Nobel Prize in Chemistry
structure of proteins, especially that of insulin



Klass. Sanger-Sequenzierung



3'

T
C
G
A
C
A
A
C

5'

Leserichtung

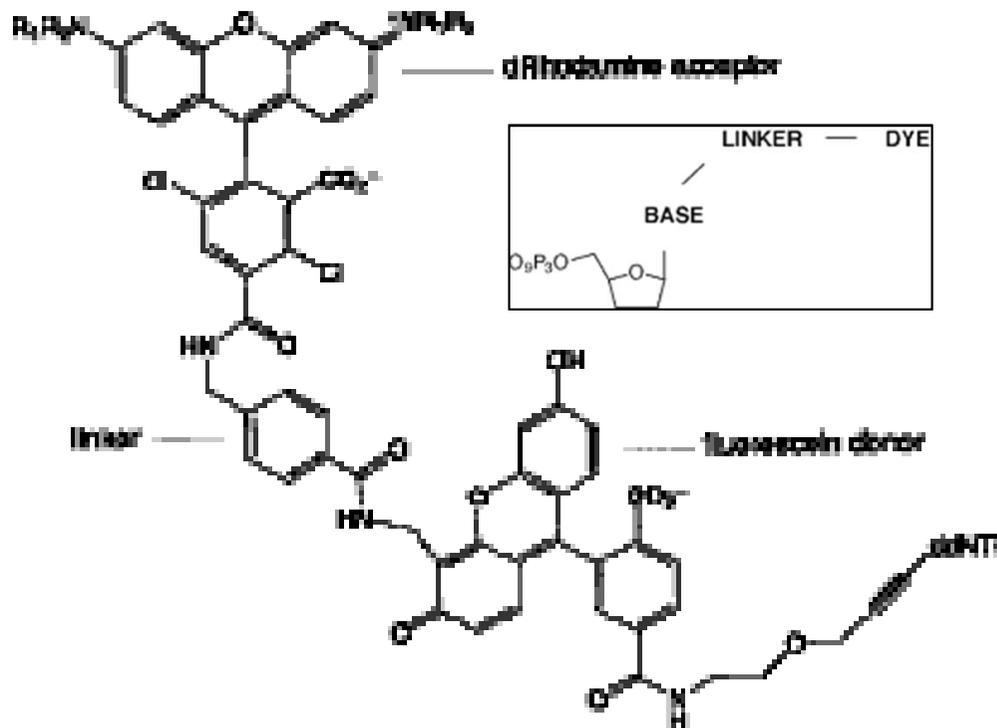
denaturierendes Acrylamid-Gel

Sequenzierung unter Verwendung von „**Dye-Terminators**“

2'3' Dideoxy-Nukleotide
mit Fluoreszenz-Gruppen > **3'-Markierung**

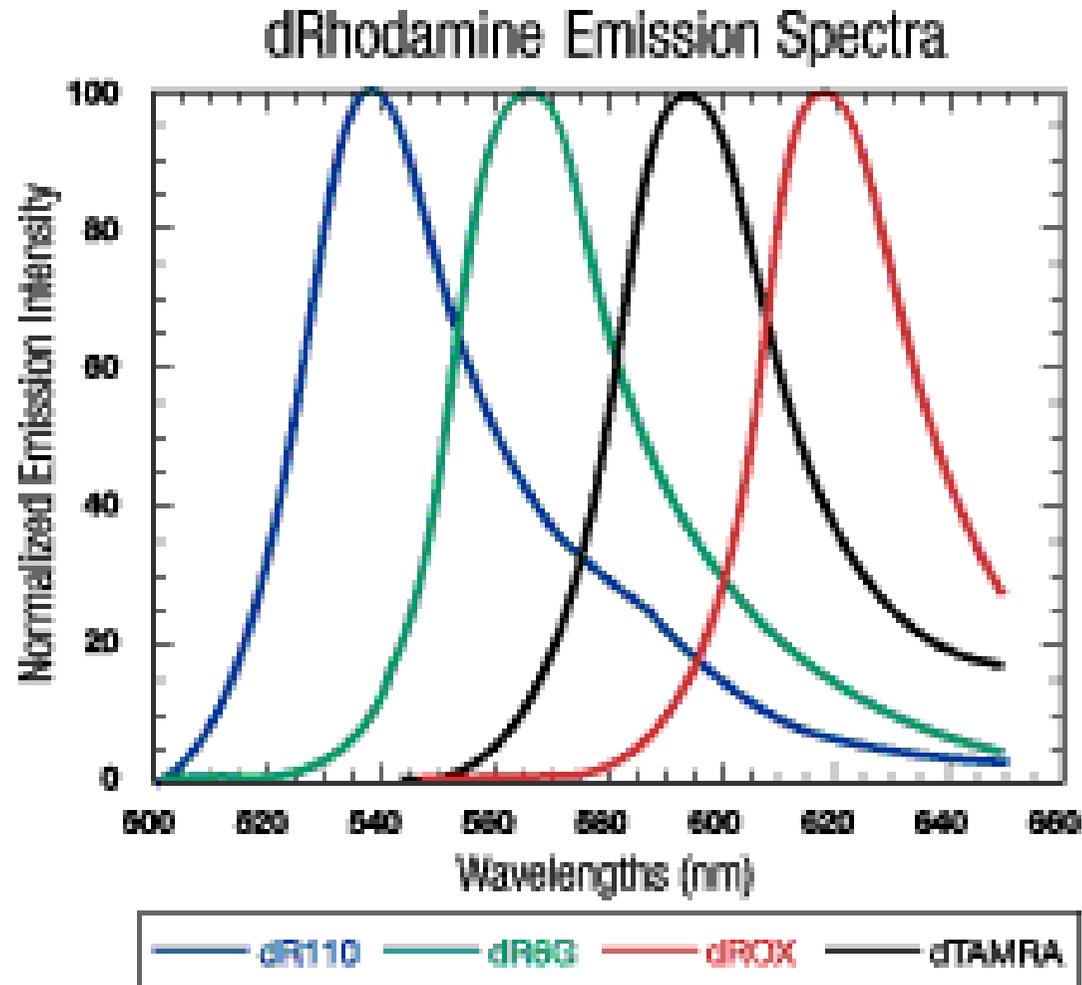


Applied Biosystems

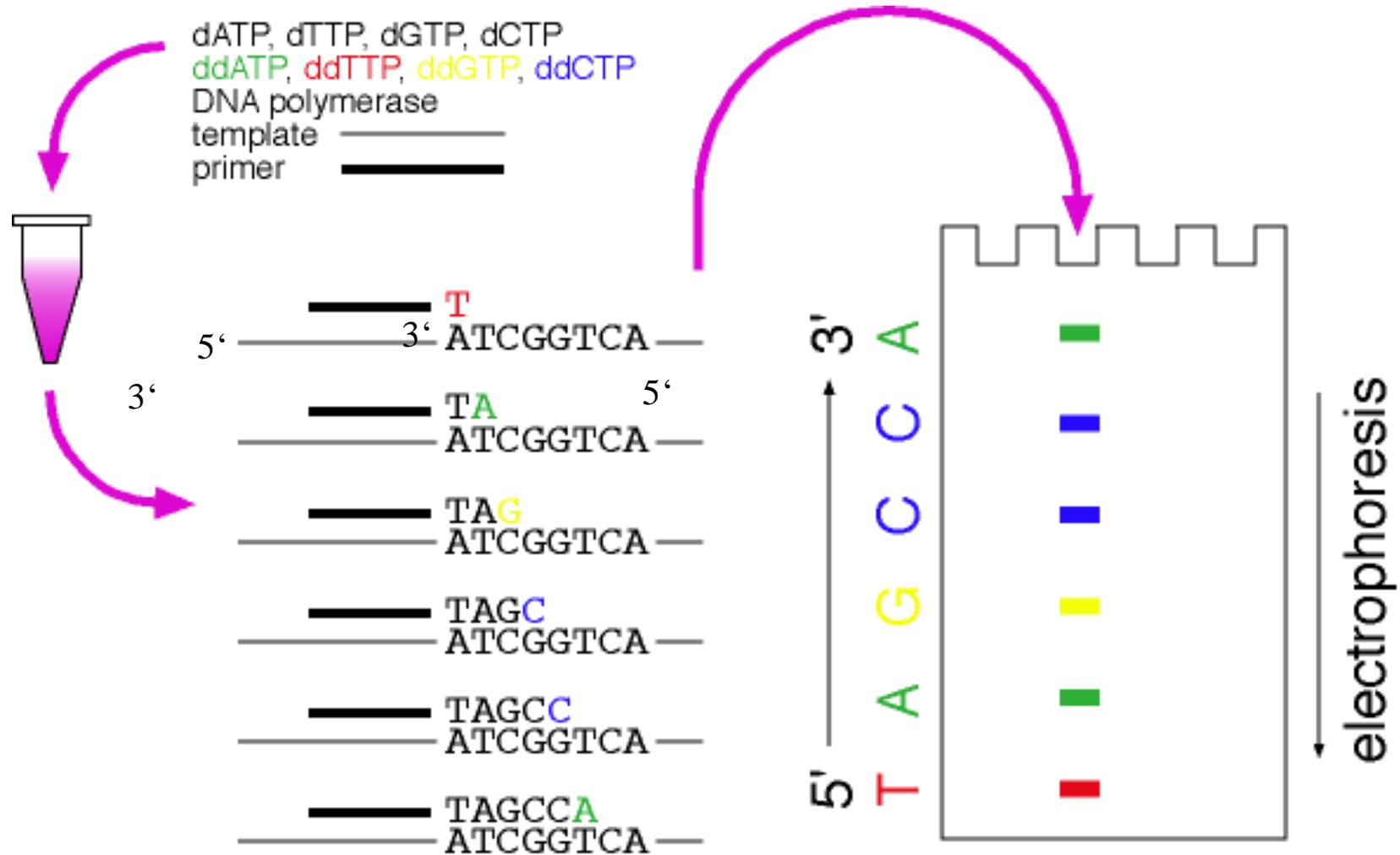


Höchste Sensitivität
durch Energie-Transfer
von Fluorescein-Donor
auf dRhodamin-Akzeptor.

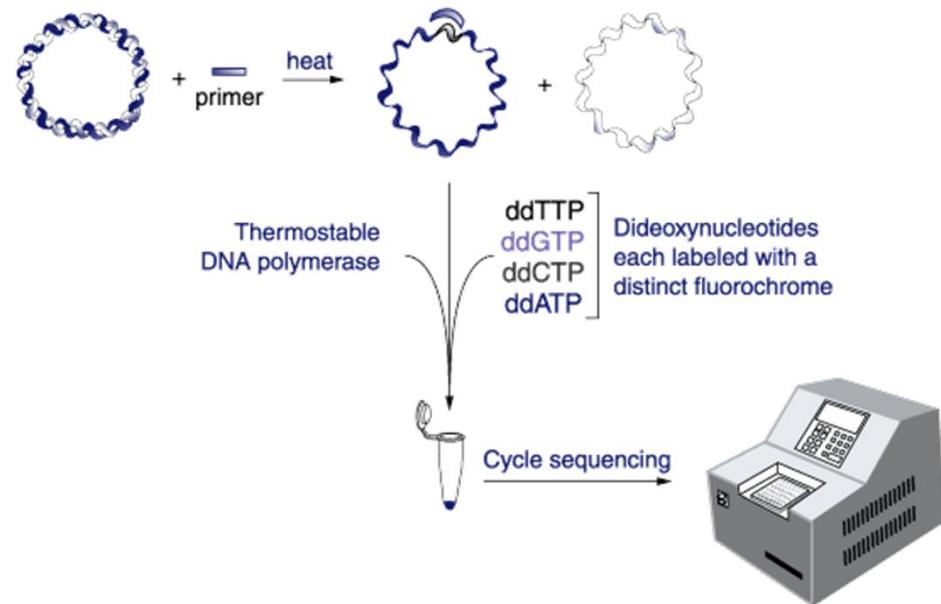
Vier unterschiedliche Spektren für die vier Basen



Vier Farben ermöglichen „one tube/ one lane“-Sequenzierung



Cycle-sequencing ermöglicht den Einsatz kleinster Mengen an Matrizen-DNA

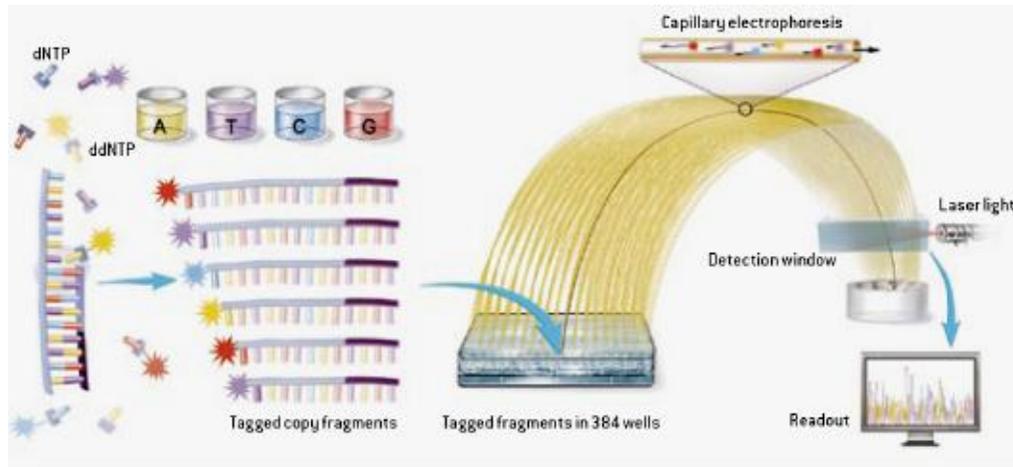


Wiederverwendung der Matrize durch zyklische Denaturierung, Primer-Bindung und Sequenzierung.

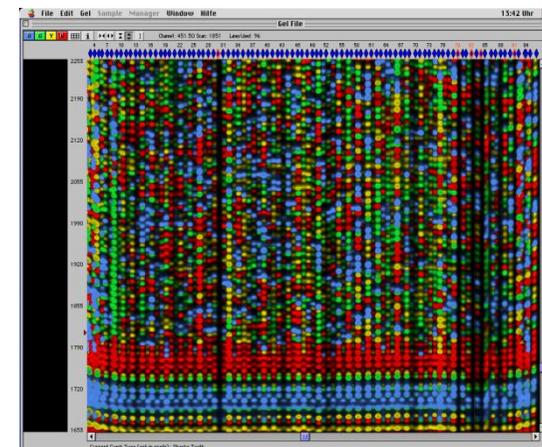
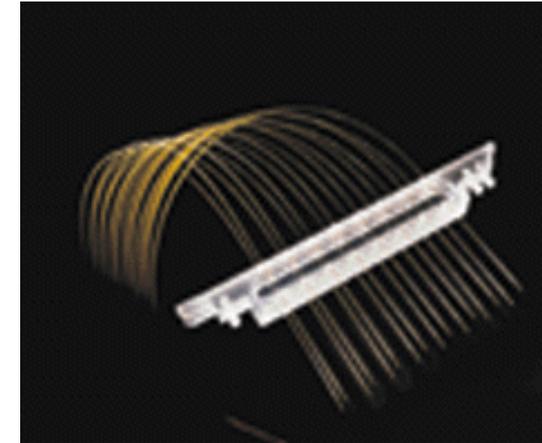
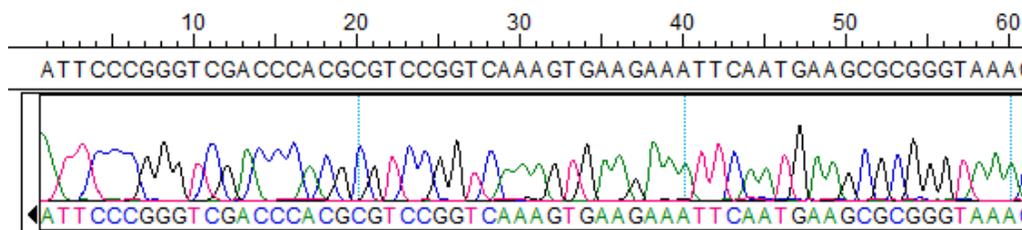
cycle sequencing macht lediglich eine lineare Amplifikation, keine geometrische!

Es ist daher keine PCR!!!!

Hochdurchsatz-DNA-Sequenzierung



Church, *Sci. American*, Jan. 2006, p. 47.



96 Spuren x 900 Basen = ca. 90 000 Basen in 2,5 Std.