

Metodi di sequenziamento del DNA

**Raffaella
Conti**

Ufficio di Staff Biotecnologie

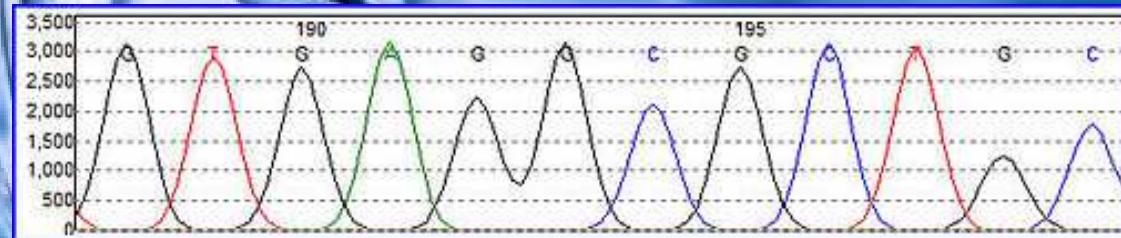
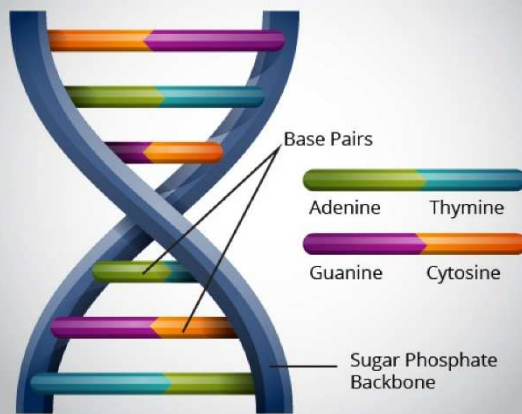


Metodi di Sequenziamento del DNA

Il sequenziamento del DNA è la determinazione dell'ordine dei diversi nucleotidi QUINDI delle 4 Basi Azotate (**A**denina, **C**itosina, **G**uanina, **T**imina) che costituiscono

l'ACIDO NUCLEICO

DNA Structure



Metodi di Sequenziamento del DNA

La sequenza del DNA contiene tutte le informazioni genetiche ereditarie che sono alla base dello sviluppo di tutti gli organismi viventi

All'interno di questa sequenza
sono codificati i geni
nonché le istruzioni per esprimerli nel tempo
e nello spazio

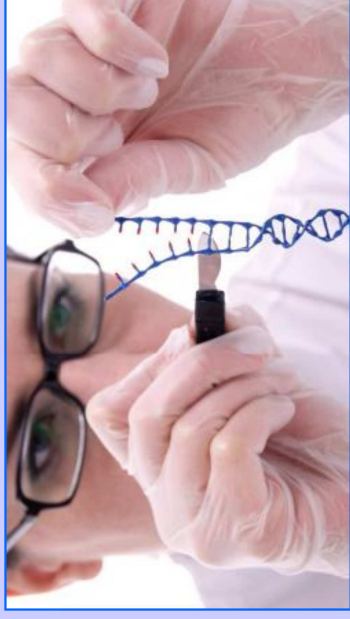
**Determinare l'esatta sequenza è utile
per la ricerca del perché e come gli organismi vivono**



Sequenziamento genico

A COSA SERVE...

- **BIOLOGIA:** capire il perché e come organismi viventi si sono evoluti e comprendere i meccanismi alla base della vita **ES:** Filogenesi



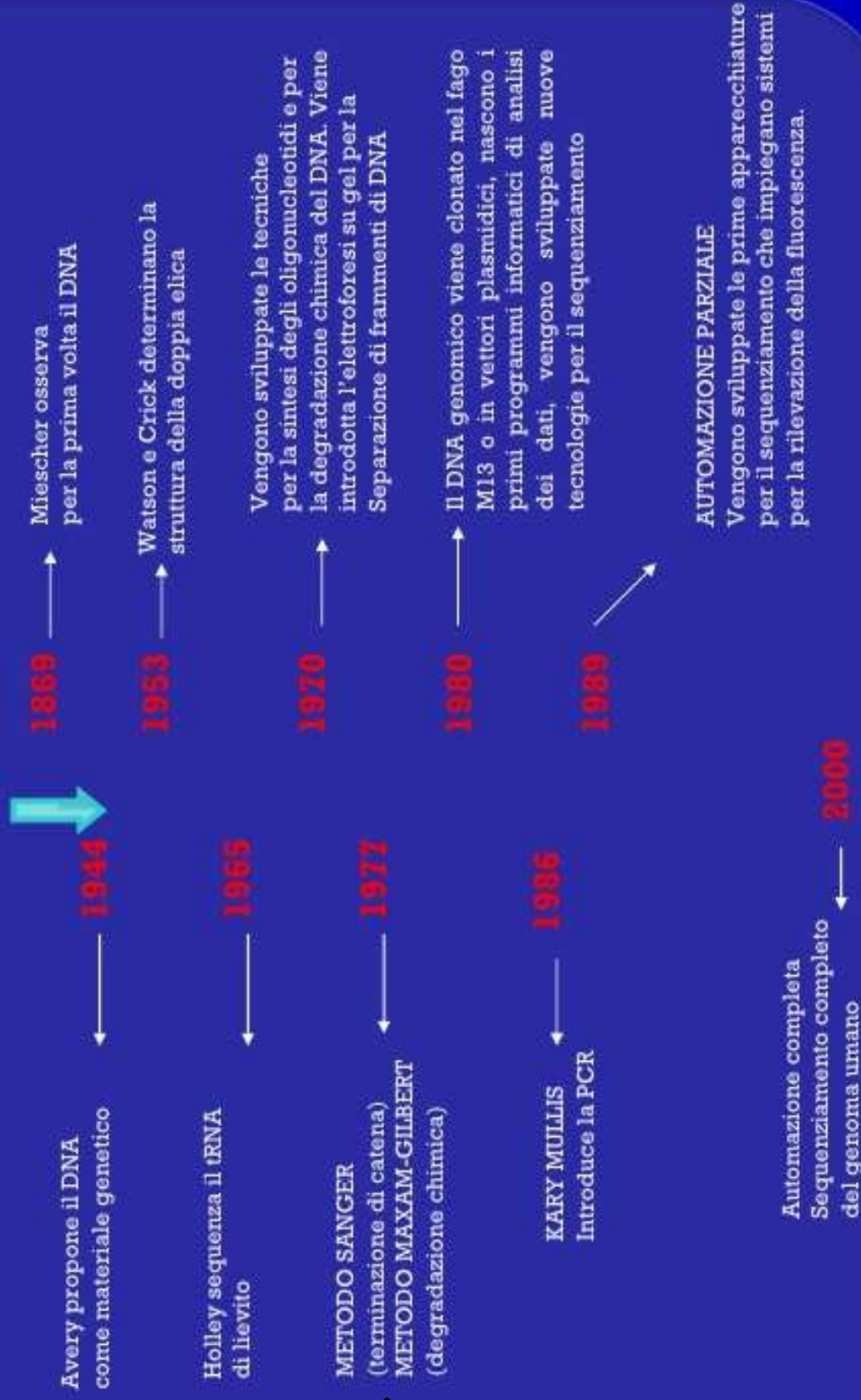
- **MEDICINA:** diagnosticare malattie ereditarie e sviluppare nuovi trattamenti **ES:** Mutazioni nucleotidiche

La conoscenza del genoma degli agenti patogeni può portare allo sviluppo di medicine contro malattie contagiose

**SCIENZE
FORENSE E
ALIMENTARI**

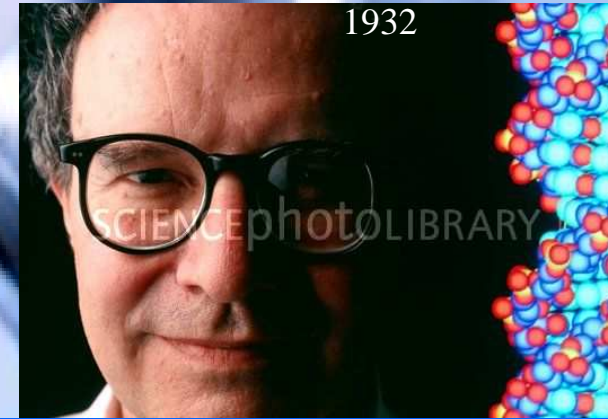


Date storiche della sequenza del DNA



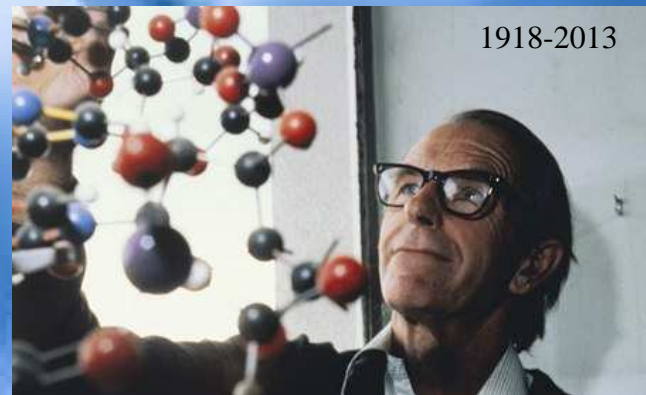
TECNICHE DI SEQUENZIAMENTO

- Metodo di **Maxam e Gilbert**
(della degradazione chimica del DNA)



*Walter Gilbert è un biochimico e fisico statunitense
premio Nobel per la chimica insieme con Frederick Sanger
"per i loro contributi riguardanti la determinazione delle sequenze di basi negli acidi nucleici"*

- Metodo **Sanger**
(a terminazione di catena)

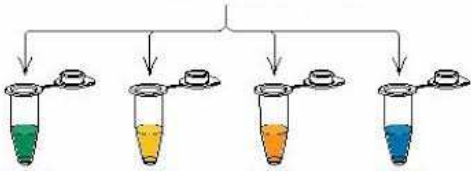


*Frederick Sanger è stato un chimico britannico, quarta persona nella storia ad essere premiata con due Premi Nobel.
Studia alla Bryanston School e quindi consegue una laurea in Scienze Naturali al St John's College di Cambridge.*

METODO SANGER

(o metodo a terminazione di
catena)

Si eseguiva in 4
provette differenti e
ciascuna richiedeva



**1. DNA stampo a doppio
filamento**

**2. Un solo primer
complementare al filamento da
sequenziare**

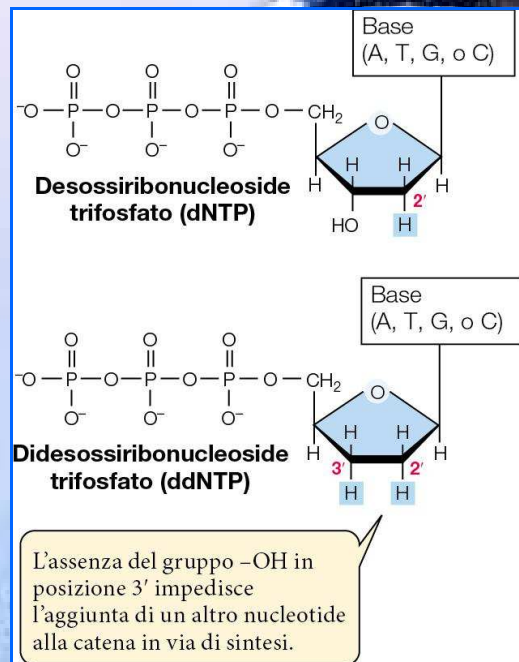
3. Taq polimerasi

**4. Una miscela di 4 dNTPs di cui uno
marcato per la visualizzazione finale dei
filamenti di una nuova sintesi dopo
elettroforesi**

**5. Terminatore di catena: ddNTPs,
diverso per ciascuna delle 4 reazioni**

ddNTPs: DIDEOSSINUCLEOTIDETRIFOSFATO

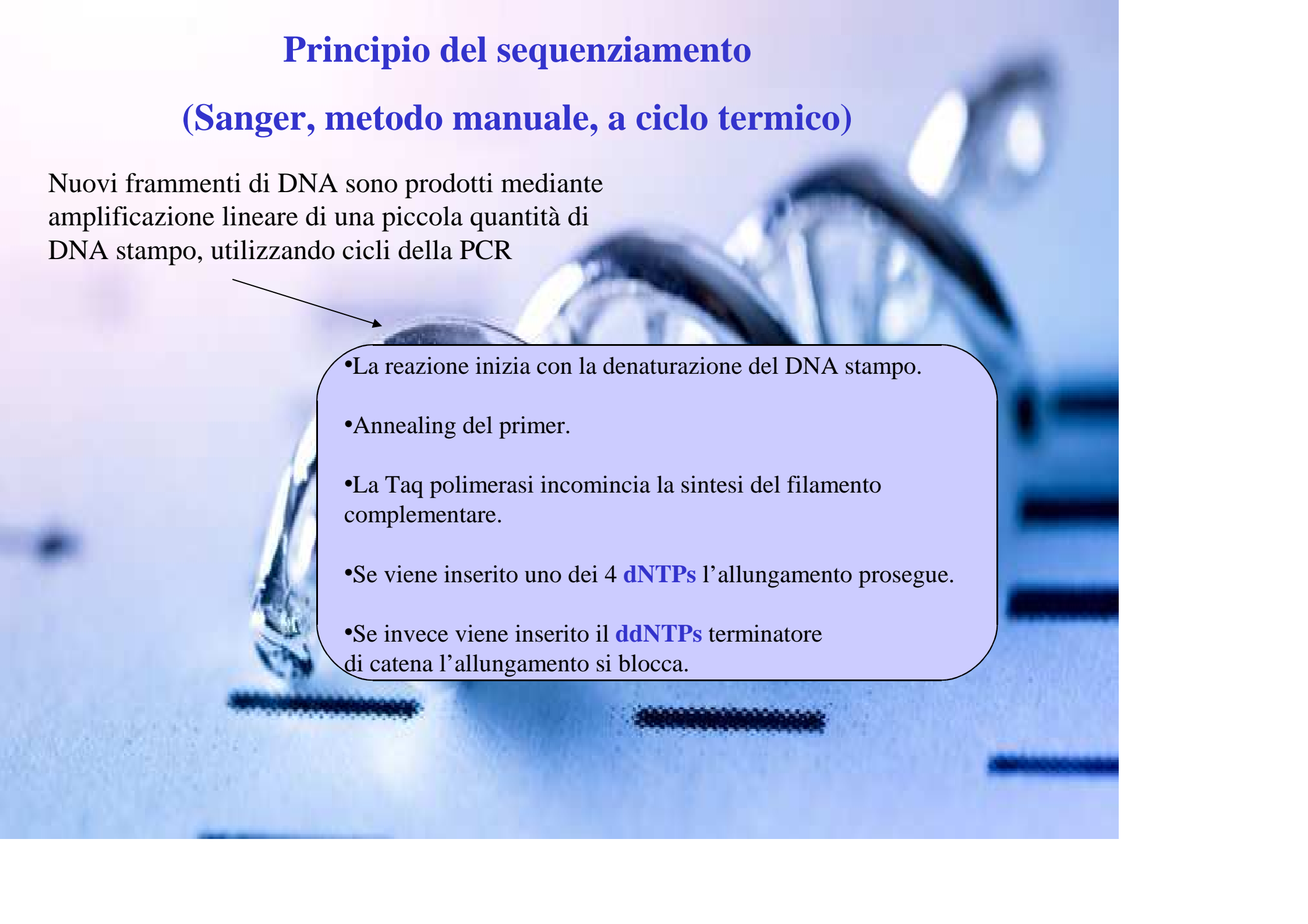
- Blocca l'allungamento del filamento di Acido nucleico poiché la mancanza del gruppo ossidrilico in 3' impedisce l'attacco dell'acido fosforico del nucleotide successivo



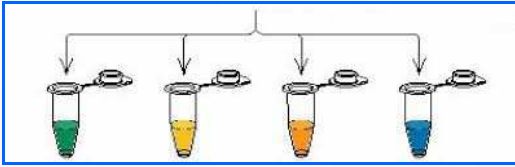
Principio del sequenziamento

(Sanger, metodo manuale, a ciclo termico)

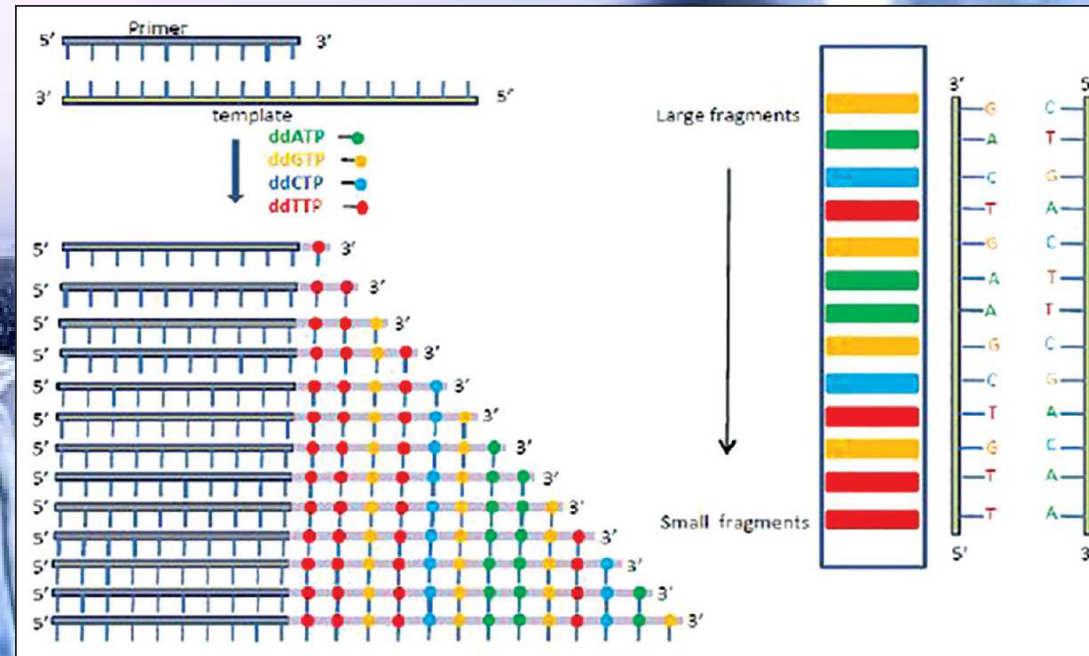
Nuovi frammenti di DNA sono prodotti mediante amplificazione lineare di una piccola quantità di DNA stampo, utilizzando cicli della PCR

- 
- La reazione inizia con la denaturazione del DNA stampo.
 - Annealing del primer.
 - La Taq polimerasi incomincia la sintesi del filamento complementare.
 - Se viene inserito uno dei 4 **dNTPs** l'allungamento prosegue.
 - Se invece viene inserito il **ddNTPs** terminatore di catena l'allungamento si blocca.

Principio del sequenziamento (Sanger, metodo manuale, a ciclo termico)



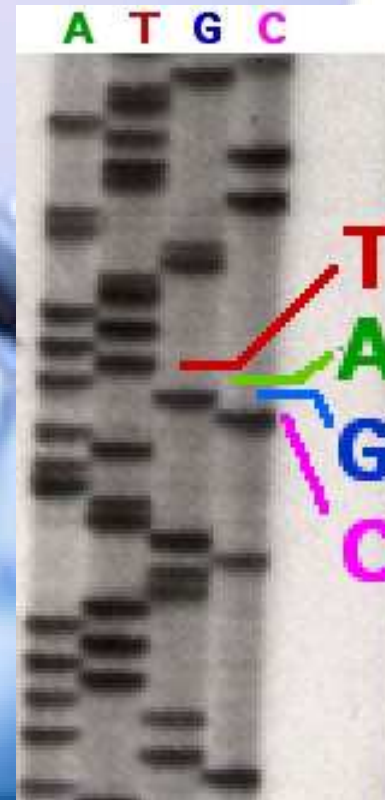
Al termine della reazione, ogni miscela contiene una popolazione di filamenti di nuova sintesi, che hanno in comune l'estremità 5' ma che differiscono in lunghezza perché la loro sintesi è stata bloccata in diverse posizioni al 3'



I filamenti marcati sono separati mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide-urea.

Gel di sequenziamento del DNA

Ognuna delle 4 reazioni è corsa su pozzetti vicini, dopodiché le bande sono visualizzate su lastra autoradiografica o sotto luce UV, e la sequenza viene letta direttamente sulla lastra o gel a seconda del tipo di marcatura dei nucleotidi dideoossi.

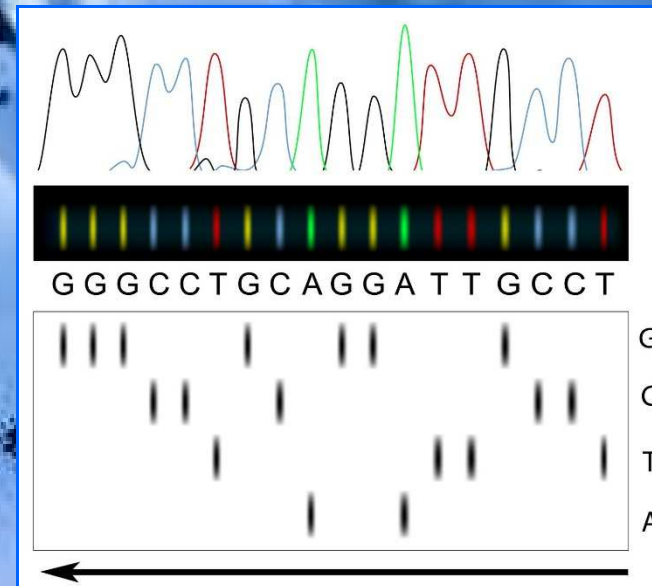
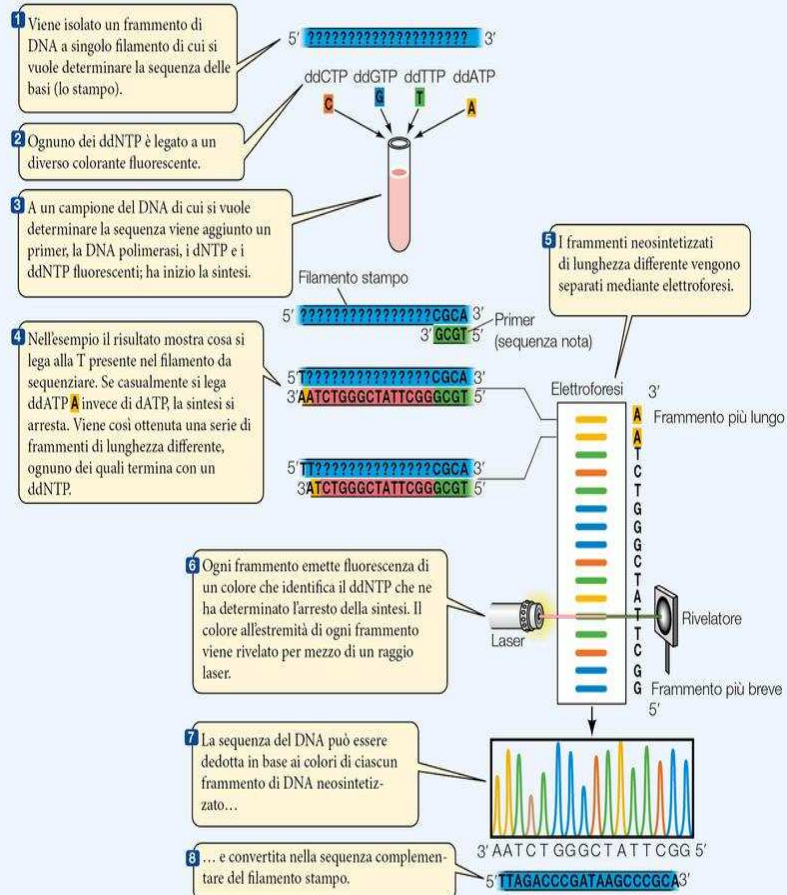


Dal basso verso l'alto il frammento di DNA ha questa sequenza:
TAGCAGATATATGGCGTTCG
ATATATTGGA ACTTCT

EVOLUZIONE...

Attualmente è possibile effettuare, anziché 4 reazioni distinte per ogni nucleotide modificato, una **sola** reazione utilizzando i 4 ddNTPs marcati fluorescentemente in modo diverso tra loro ed utilizzando lettori ottici appropriati

In questo modo ogni filamento di DNA emetterà una luce di colore diverso in base al nucleotide (ddNTP) col quale terminerà

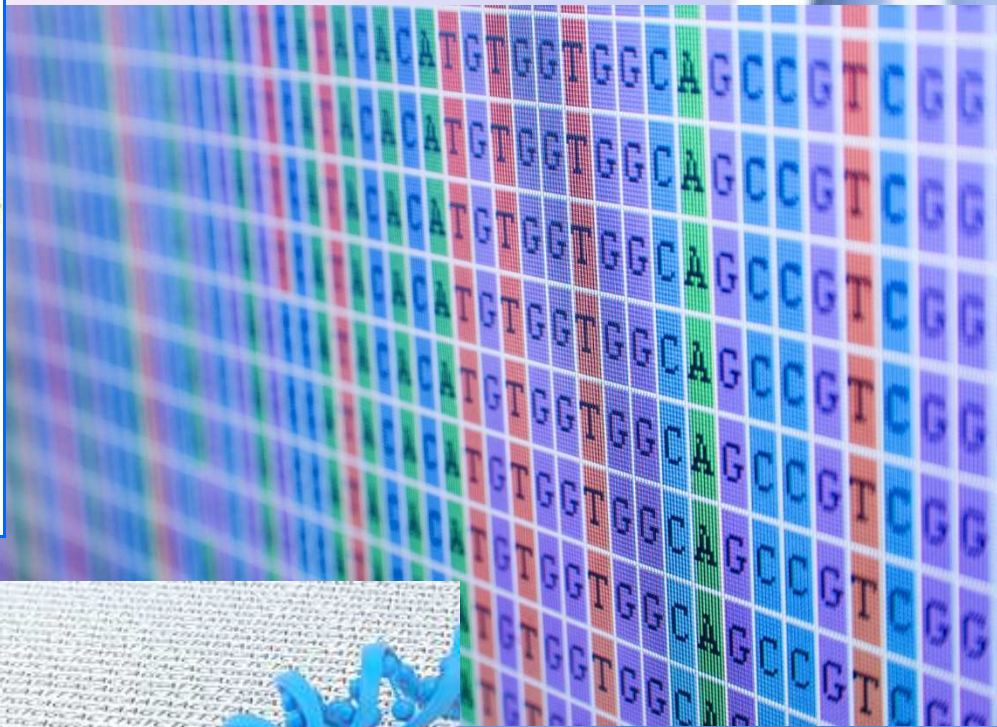


...Riepilogo...

My Movie.wmv



GRAZIE.....



Continua....

...NGS...

