University of Isfahan

Faculty of Biological Science and Technology

Department of Cell and Molecular Biology and Microbiology

Farzaneh Forouharfar

عنوان:

آشنایی با اصول تعیین توالی DNA

Familiarity with principles of DNA sequencing

Farzaneh Forouharfar

اهداف آزمایش

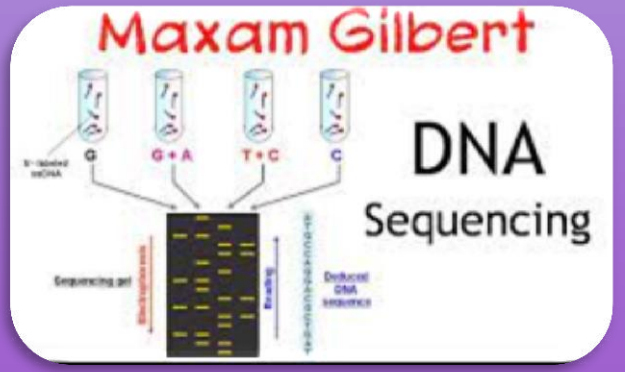
- ✓ تعیین توالی دی ان ای از روی ژل
- ✓ آشنایی با روش‌های اتوماتیک تعیین توالی
- ✓ قرائت گراف‌ها

مقدمه

تعیین توالی مولکول دی ان ای (DNA sequencing) یکی از روش‌های متداول بیولوژی مولکولی است. این عمل با دو روش شیمیایی و آنزیمی امکان‌پذیر است. ای این دو روش، روش آنزیمی متداول‌تر بوده و به راحتی انجام آن در اغلب آزمایشگاه‌های ژنتیک و بیولوژی مولکولی امکان‌پذیر می‌باشد. روش مزبور اساس تعیین توالی با دستگاه‌های اتوماتیک را نیز تشکیل می‌دهد. تعیین توالی دی ان ای عبارت است از مشخص نمودن ردیف نوکلئوتیدهای (واحدهای ساختمانی) یک مولکول دی ان ای .تعیین توالی نه‌تنها برای یک دی ان ای مجهول تازه استخراج شده، به کار گرفته می‌شود؛ بلکه در روش‌های تشخیص مولکولی بیماری‌های ژنتیک و سرطان برای تعیین جهش‌ها نیز مورد استفاده می‌باشد. همچنین در مطالعات مولکولی و کار با مولکول دی ان ای و بررسی جهش‌ها و نوترکیبی در دنا کارایی بسیار زیادی دارد.به طوری که در اغلب آزمایشگاه‌های ژنتیک، بیولوژی مولکولی و تشخیص طبی مولکولی امکاناتی برای تعیین توالی دی ان ای وجود دارد. امروزه دو روش مختلف برای تعیین توالی بازهای دی ان ای وجود دارد: (روش شیمیایی و آنزیمی که عبارت‌اند از:

1. روش ماکسام-گیلبرت (شیمیایی)

2.روش سانجر (آنزیمی)



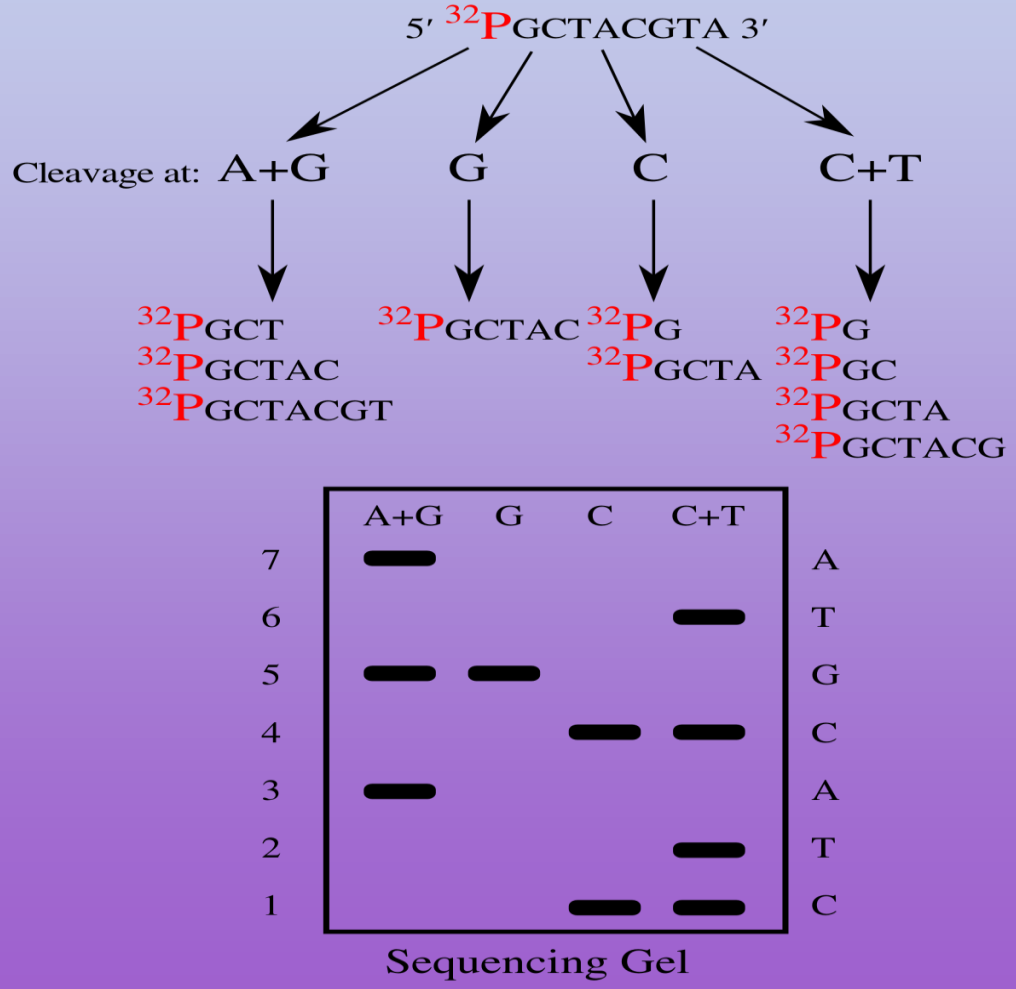
Farzaneh Forouharfar

1. روش ماکسام-گیلبرت (روش شیمیایی):

در این روش تعداد زیادی نسخه‌های یکسان از یک قطعه دنا نیاز است. این کار امروزه با استفاده از تکنیک PCR (Polymerase Chain Reaction) صورت می‌گیرد. ولی با استخراج مقدار زیادی دنای موردنظر از خود موجود نیز می‌توان قطعات یکسان با تعداد زیاد بدست آورد. پس از تهیه‌ی قطعات یکسان دنا به میزان زیاد، به ترتیب مراحل زیر انجام می‌شود:

الف) نشان‌دار کردن فسفر انتهایی ’5: در ابتدا فسفات ’5 را با یک فسفاتاز برداشته و با استفاده از ATP نشان‌دار و آنزیم ATP Kinase خاص فسفات نشان‌دار را به انتهای ’5 می‌چسبانند. پس از این کار، رشته در دو انتهای ’5 نشان‌در خواهد بود.

ب)برش با یک آنزیم محدودالاثر: در این مرحله قطعه‌ی دنا را با یک آنزیم محدودالاثر به طور نامساوی می‌شکنند و به‌وسیله‌ی الکتروفورز آن‌ها را جدا کرده و در مرحله‌ی بعد، تعیین توالی بر روی هر قطعه به طور جداگانه انجام خواهد گرفت. در آخر توالی‌های به دست آمده در کنار هم قرار گرفته وتوالی کلی قطعه‌ی دنا تعیین می‌گردد.


5′ 32PGCTACGTA 3′
Cleavage at: A+G G C C+T
32PGCT
32PGCTAC
32PGCTACGT
32PGCTAC
32PG
32PGCTA
32PG
32PGC
32PGCTA
32PGCTACG
A+G G C C+T
7 6 5 4 3 2 1
A T G C A T C
Sequencing Gel

ج) جداسازی دو رشته‌ی دی ان ای **:** با استفاده از حرارت، دو رشته‌ی قطعه‌ی دنا از هم جدا می‌شوند.

د) ایجاد شکاف با استفاده از مواد شیمیایی: در این مرحله قطعات دنا در چهار لوله‌ی مختلف تقسیم شده و به هر لوله مواد شیمیایی خاصی اضافه می‌شود. خاصیت این مواد این است که در محل‌های بازهای خاص در رشته‌ی دنا شکاف ایجاد می‌کنند (مثلا فقط در حل سیتوزین یا فقط در محل تیمین یا آدنین یا گوانین). به دلیل واکنش‌های شیمیایی که باعث اختصاصی شدن واکنش‌ها برای یک باز خاص می‌شود، روش ماکسام-گیلبرت به روش شیمیایی موسوم است.

ه) الکتروفورز قطعات حاصل از شکست‌های شیمیایی: محتویات هر لوله به طور جداگانه به چاهک‌های ژل الکتروفورز (در این مورد ژل پلی آکریل آمید) انتقال داده و با مدت زمان و ولتاژ استاندارد الکتروفورز می‌کنیم. دقت الکتروفورز به حدی است که می‌توان قطعات با اختلاف یک نوکلئوتید را از هم جدا کرد. سپس یک ورقه فیلم عکاسی حساس به اشعه X را روی ژل قرار می‌دهند که در آن نواحی که فسفر رادیواکتیو وجود دارد بر روی فیلم نوارهای تیره ایجاد می‌شود. به این روش «اتورادیوگرافی» (Autoradiography) می‌گویند.

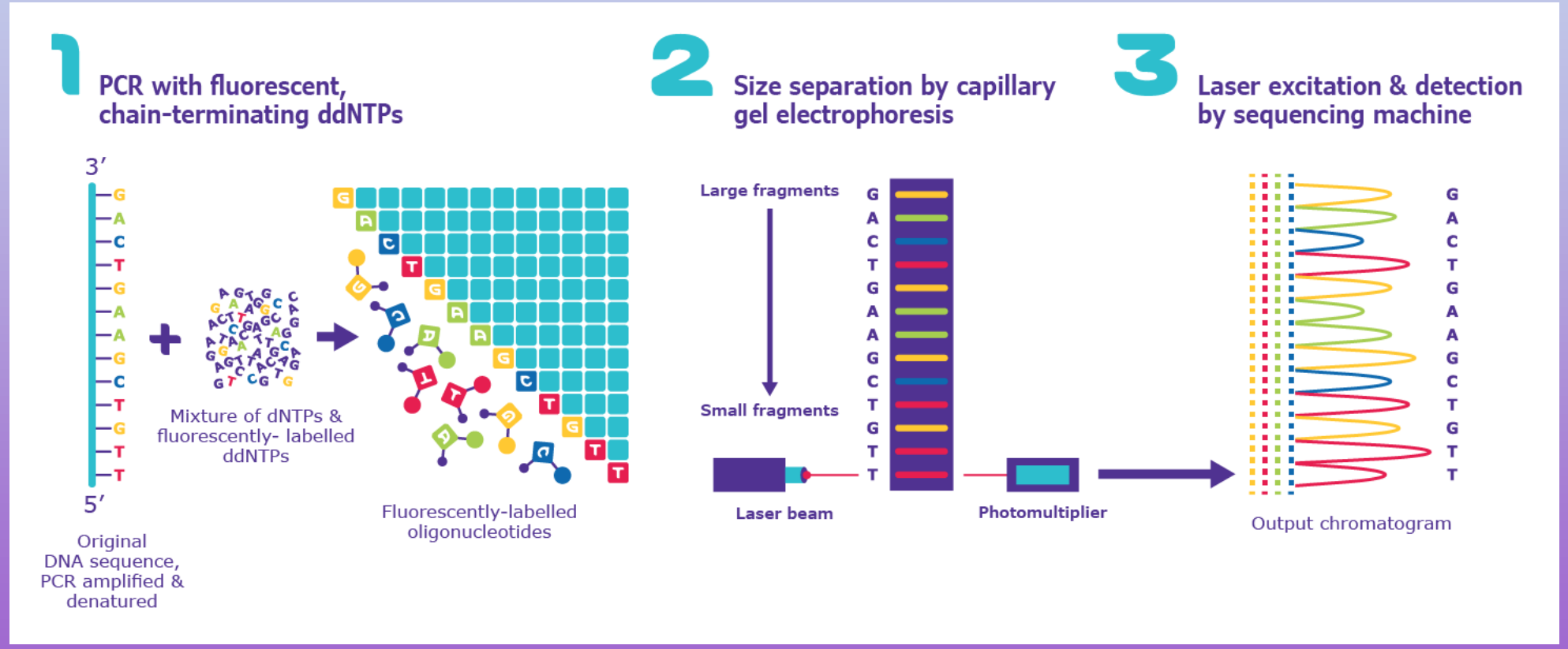
برای تعیین تعداد نوکلئوتیدها، در یک ستون جداگانه از الکتروفورز یک نمونه شاهد با توالی مشخص قرار می‌دهند و بعدا با استفاده از آن‌ها تعداد نوکلئوتید قطعات دیگر را تعیین می‌کنند. پس از انجام الکتروفورز از روی ژل دورترین نوکلئوتیدهای آنالیز شده نسبت به شروع الکتروفورز به ترتیب توالی را تعیین می‌کنند.

روش سانجر (روش آنزیمی): این روش اولین بار توسط آقای F. Sanger ارائه شد و بر اساس استفاده از دی داکسی ریبوز به جای داکسی ریبوز است. همانطور که می‌دانید برای اضافه شدن نوکلئوتیدها به زنجیره‌ی پلی‌نوکلئوتیدی دی ان ای وجود عامل OH– در ناحیه‌ی 3’ قند داکسی ریبوز ضروری است و در صورتی که این عامل با یک هیدروژن جایگزین شود، نوکلئوتیدهای بعدی نمی‌توانند به این قند متصل شوند.

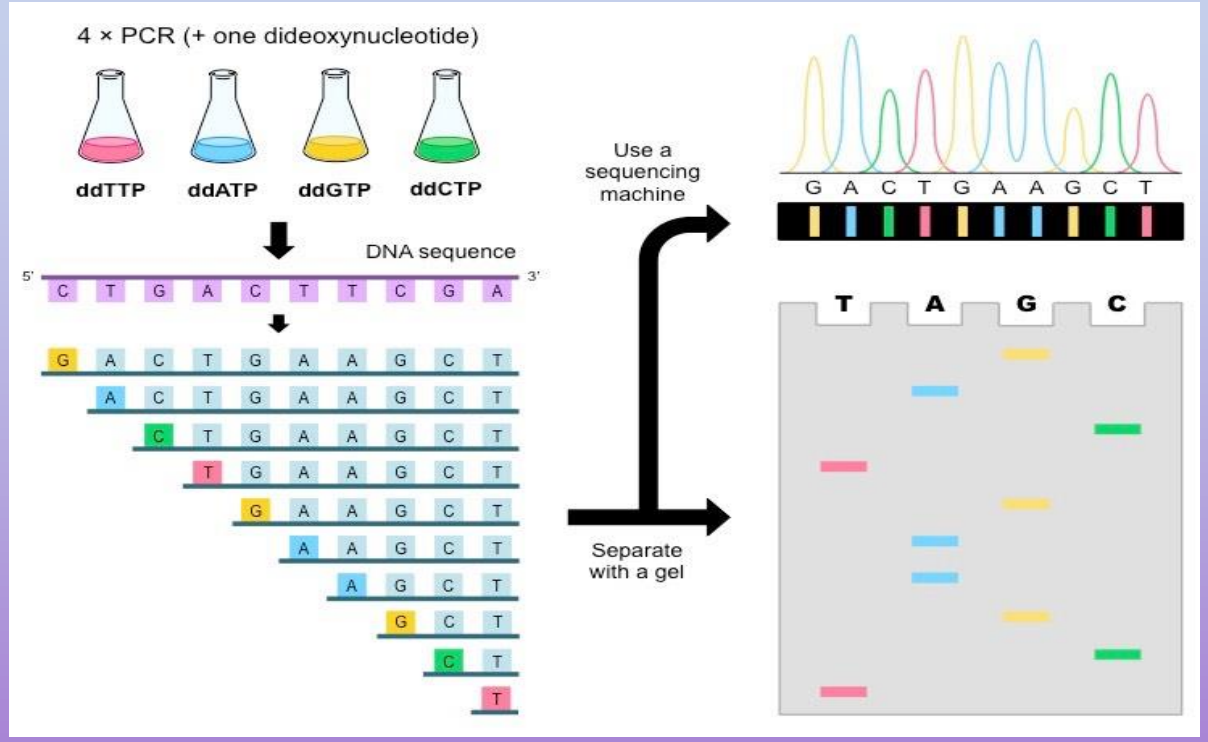
برای شروع کار داخل چهار لوله مقداری از دی ان ای موردنظر برای تعیین توالی، مقداری پرایمر و آنزیم دناپلیمراز و مقادیر مساوی از چهار نوکلئوتید dTTP، dATP، dCTP و dGTP اضافه می‌کنندو ه ترتیب زیر عمل می‌شود:

در لوله‌ی شماره(1) کمی ddTTP اضافه می‌شود، در نتیجه قطعات مختلفی حاصل می‌شود که به باز تیمین (مکمل آدنین در زنجیره‌ی اصلی) ختم می‌شوند.

در لوله‌ی شماره(2) کمی ddATP اضافه می‌گردد در نتیجه باز انتهایی قطعات در حال ساخت سیتوزین استو به همین ترتیب در لوله‌ی (3) و (4) به ترتیب ddCTP و ddGTP اضافه شده و باز انتهایی سیتوزین و گوانین است.


1
PCR with fluorescent, chain-terminating ddNTPs
3′
G A C T G A A G C T G T T
5′
Original DNA sequence, PCR amplified & denatured
Mixture of dNTPs & fluorescently- labelled ddNTPs
Fluorescently-labelled oligonucleotides
2
Size separation by capillary gel electrophoresis
Large fragments
Small fragments
Laser beam
Photomultiplier
3
Laser excitation & detection by sequencing machine
G A C T G A A G C T G T T
Output chromatogram

باید توجه داشت که نسبت بین نوکلئوتیدهای دی داکسی به نوکلئوتیدهای داکسی در حدود یک به ده است. در نتیجه قطع شدن به طور نسبی صورت می‌گیرد و امکان ایجاد تمامی قطعات وجود خواهد داشت. در پایان محتویات لوله را مانند روش قبل الکتروفورز کرده و سپس اتورادیوگرافی می‌کنند و ژل را به ترتیب از بالا به پایین می‌خوانند (یعنی از دورترین محل نسبت به شروع الکتروفورز)



شمای الکتروفورز تعیین توالی دی ان ای با روش سانجر به صورت اتوماتیک و نیمه‌اتوماتیک

روش‌های فوق بسیار ظریف، مشکل و وقت‌گیر هستند. با این روش‌ها قطعاتی با حداکثر چندصد نوکلئوتید را می‌توان تعیین توالی کرد. این روش‌ها به هیچ وجه برای تعیین توالی عظیمی مانند تعیین توالی ژنوم انسان و یا حتی یک سلول مخمر مناسب نمی‌باشد.

امروزه با پیشرفت تکنولوژی دستگاه‌های اتوماتیک برای تعیین توالی دی ان ای ابداع شده است.

روش اتوماتیک یکی از دستاوردهای نوین کامپیوتر برای علوم مولکولی می‌باشد. اساس این روش‌ها همان روش سانجر است. در این روش از چهار نوع نوکلئوتید دی داکسی که به چهر گروه فلورسانت مختلف متصل می‌باشند؛ استفاده می‌شود. هرکدا از این چهار نوع نوکلئوتید مختلف را به یکی از لوله‌ها اضافه می‌کنند. در نتیجه هنگامی که ژل در برابر نور U.V قرار گیرد؛ هر کدام از محصولات با رنگی متفاوت مشخص می‌شوند که هر رنگ نشان‌دهنده‌ی یک قطعه حاصل از باز های دی داکسی خاص می‌باشد.

در این روش قطعات دنای موردنظر را به چهار لوله اضافه کرده و شرایط لازم همانندسازی را فراهم می‌نمایند. پس از پایان کار ژل را در یک دستگاه اسپکتروفوتومتر اتوماتیک متصل به کامپیوتر قرار می‌دهند. این دستگاه رنگ فلورسانس را تعیین و به کامپیوتر گزارش می‌دهد و کامپیوتر با تغییر رنگ حاصل از اسپکتروفوتومتر توالی موردنظر را تعیین می‌کند.

در دستگاه‌های پیشرفته روش اتوماتیک این ژل یکبار مصرف نمی‌باشد، بلکه به طور ثابت روی اسپکتروفوتومتر نصب می‌شود و مخلوط قطعات دنا از بالا تزریق و به ترتیب از مقابل اسپکتروفوتومتر عبور می‌کنند و توالی آن‌ها به وسیله‌ی کامپیوتر ثبت می‌شود (مانند سربازانی که به طور مرتب از جلوی یک جایگاه رژه می‌روند.

Farzaneh Forouharfar

روش کار:

با استفاده از اتورادیوگراف آماده که در اختیار شما قرار می‌گیرد؛ ترادف دی ان ای تعیین توالی شده را مشخص نمایید.