KURS

„BIOLOGIA POD KLUCZ"

SEKWENCJONOWANIE DNA METODĄ SANGERA

Prezentacja jest chroniona prawnie przed kopiowaniem bez pisemnej zgody autora i stanowi „utwór" i w myśl Ustawy z dnia 4 lutego 1994 r. o prawie autorskim i prawach pokrewnych (Dz. U. z 1994 r., Nr 24, poz. 83 z późn. zm.).

PODSTAWA PROGRAMOWA 2025



1. Przedstawia istotę technik stosowanych w inżynierii genetycznej - sekwencjonowanie DNA metodą Sangera.

SEKWENCJONOWANIE DNA

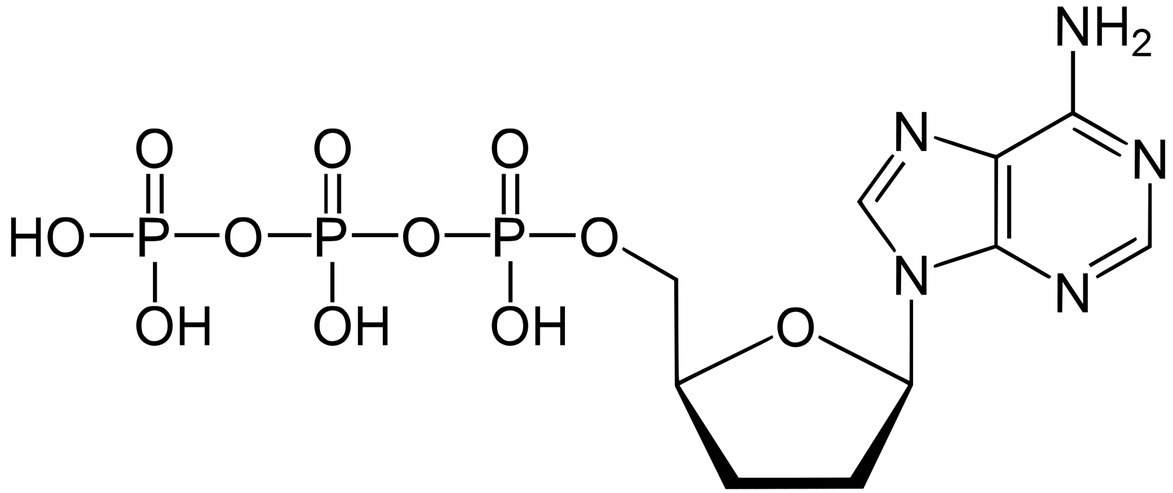


Sekwencjonowanie DNA to metoda inżynierii genetycznej, dzięki której możliwe jest **ustalenie kolejności nukleotydów w DNA**.

Metoda sekwencjonowania DNA Sangera jest złożona, bo łączy ze sobą inne techniki - **technikę PCR** oraz **elektroforezę DNA**.

DIDEOKSYNUKLEOTYDY

W metodzie Sangera wykorzystywane są **dideoksynukleotydy** (ddNTP). Nukleotydy te **nie posiadają grupy hydroksylowej -OH w pozycji 3' deoksyrybozy**, przez co **niemożliwe jest wytworzenie wiązania fosfodiestrowego** i dołączenie do nich kolejnego nukleotydu. Przyłączanie dideoksynukleotydu do wydłużającej się nici DNA skutkuje **zatrzymaniem reakcji wydłużania nowej nici DNA**.



PRZEBIEG REAKCJI



Przebieg reakcji można przedstawić następująco:

1. **Reakcja PCR (specjalna wersja)** - synteza nowych nici, komplementarnych do matrycy DNA z użyciem „standardowych” deoksyrybonukleotydów w dużym nadmiarze i niewielkiej ilości oznakowanych dideoksynukleotydów, a także startera i enzymu polimerazy DNA.

2. **Elektroforeza (specjalna wersja)** - cząsteczki DNA są rozdzielane według wielkości.

3. **Analiza** prążków przez „komputer”, który przetwarza je na sekwencję DNA.

PRZEBIEG REAKCJI

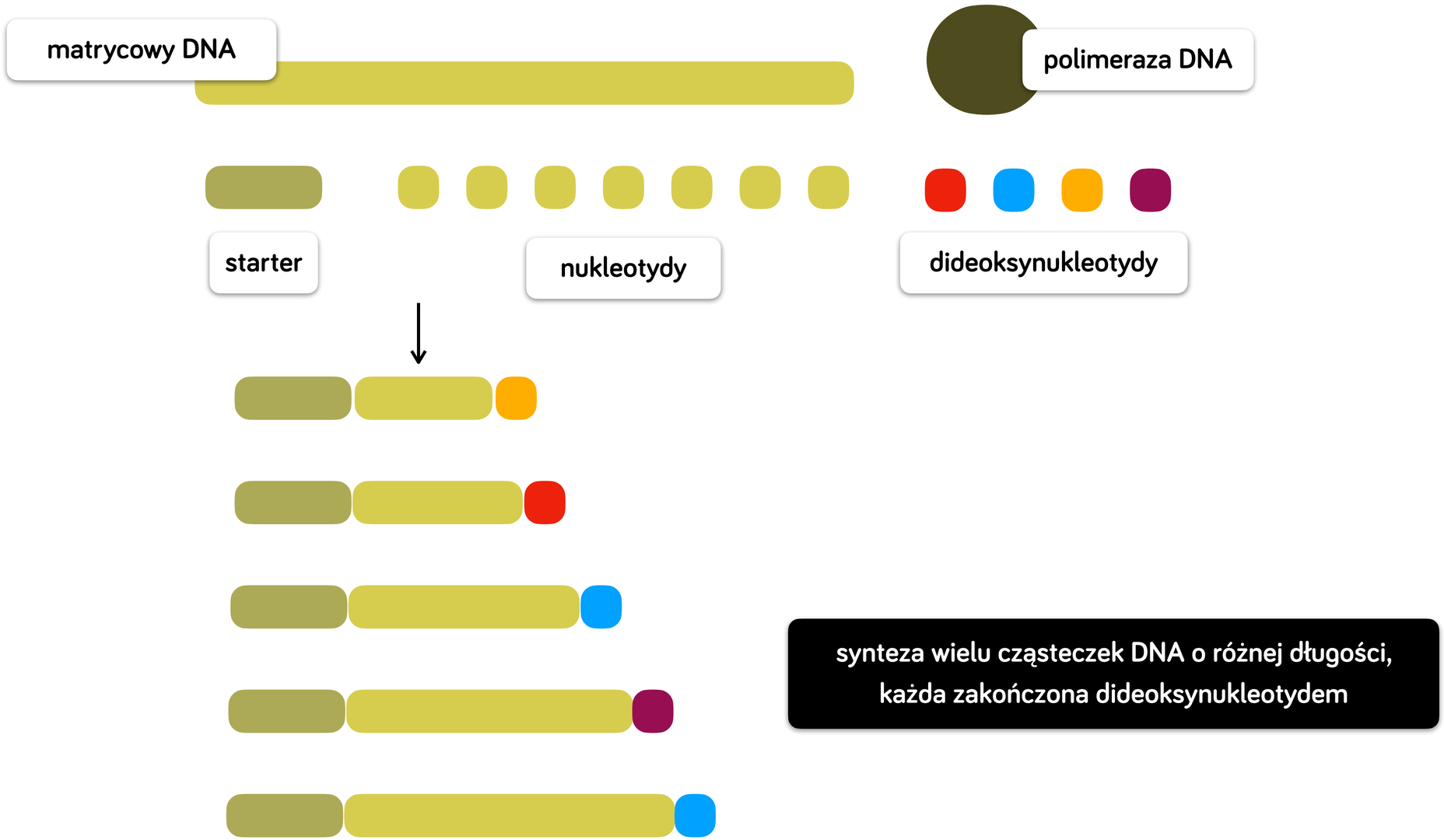


Powielanie cząsteczki DNA matrycowego (badanego) przeprowadza się w mieszaninach reakcyjnych zawierających: **wolne nukleotydy DNA, dideoksynukleotydy, startery i polimerazę DNA**.

Do niektórych nowych łańcuchów DNA wbudowany zostaje **dideoksynukleotyd**, zamiast prawidłowego nukleotydu. Wtedy to proces syntezy zostaje **przerwany**, właśnie tam gdzie został przyłączony dideoksynukleotyd. **ddNTP jest oznaczony barwnikiem fluorescencyjnym** (każdy innym barwnikiem).

Powstają więc **cząsteczki DNA o różnej długości**, które są niepełnymi, komplementarnymi kopiami matrycowego badanego DNA, a ich ostatnim nukleotydem jest **ddNTP**.

PRZEBIEG REAKCJI



synteza wielu cząsteczek DNA o różnej długości, każda zakończona dideoksynukleotydem

PRZEBIEG REAKCJI – ELEKTROFOREZA



Wszystkie te cząsteczki są ze sobą wymieszane, jednak można je **uporządkować pod względem wielkości**, poddając je rozdziałowi **elektroforetycznemu**.

Elektroforeza oddziela fragmenty DNA na podstawie ich długości.

Im **krótsze** są cząsteczki DNA (im mniej nukleotydów zostało dołączonych), tym **szybciej i dalej** wędrują podczas elektroforezy w kierunku **elektrody dodatniej**.

PRZEBIEG REAKCJI – ANALIZA PRĄŻKÓW



Po rozdzieleniu fragmentów DNA, każde z końcowych miejsc jest analizowane przez specjalistyczny komputer.

Każdemu dideoksynukleotydowi przypisana jest inna barwa, którą odczytuje komputer przy każdym fragmencie. Efektem tego jest ustalenie nukleotydu kończącego dany fragment.

Komputer analizuje w jakiej kolejności fragmenty DNA rozdzieliły się na żelu i odczytuje, który fragment ma jaką zasadę na końcu. Na podstawie tych danych **komputer rekonstruuje całą sekwencję analizowanego DNA.**