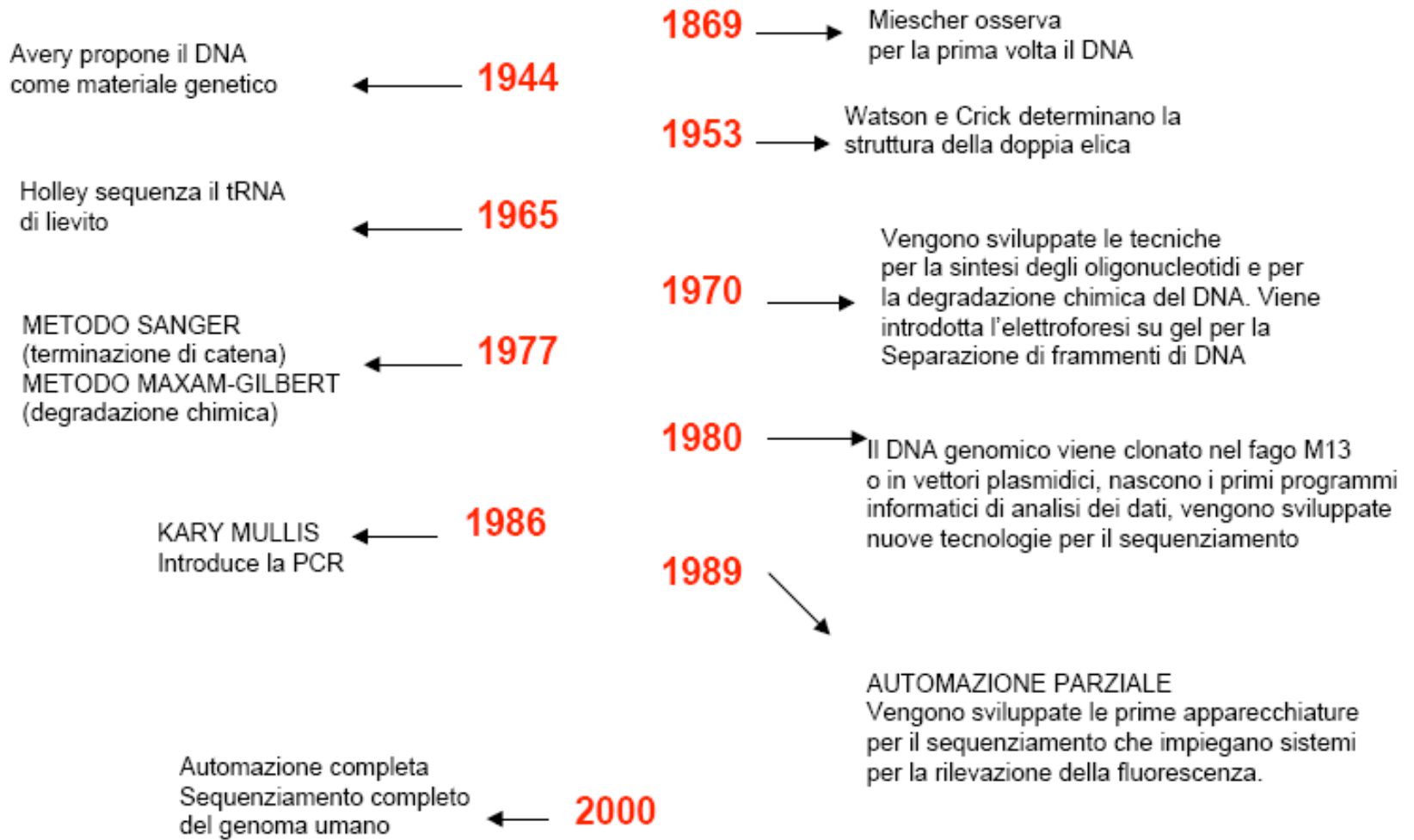


# Il sequenziamento genico

# Tappe storiche



## **Step comuni a tutte le metodiche di sequenziamento**

Preparazione DNA stampo

Separazione

Rilevazione frammenti di DNA

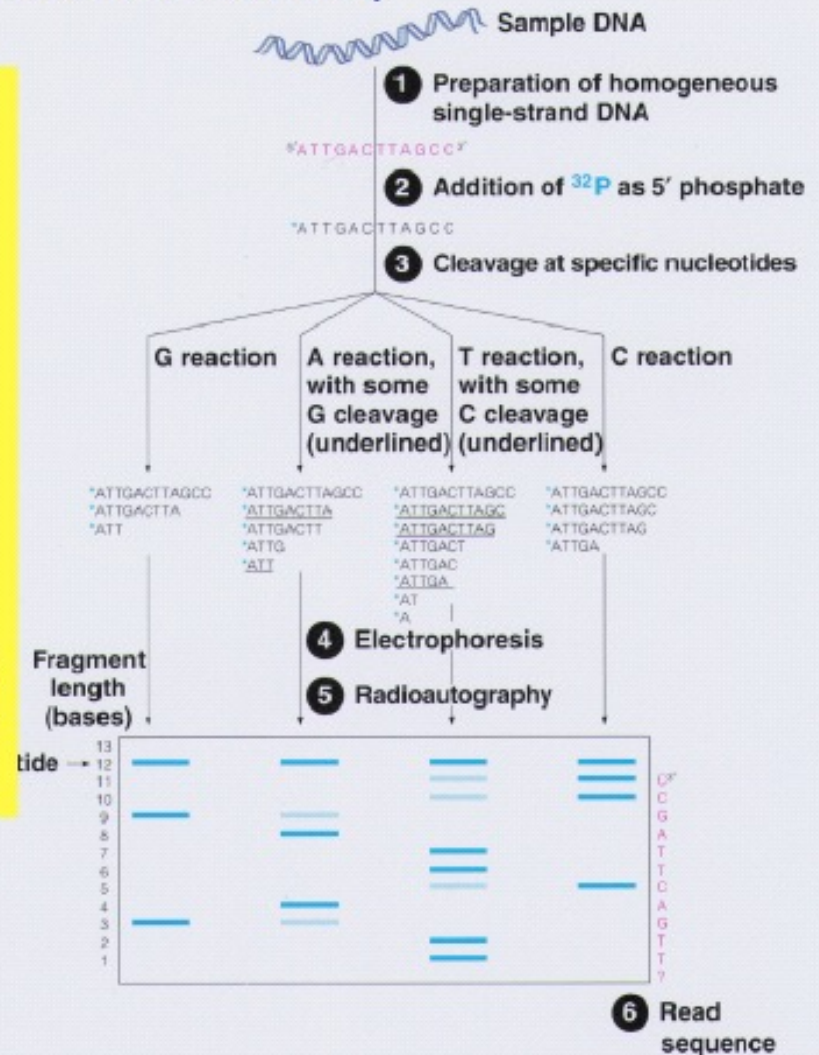
Lettura della sequenza

# Il metodo Maxam-Gilbert

(sequenziamento a degradazione chimica)

basato sulla degradazione chimica di frammenti di DNA a doppio filamento, è ormai poco utilizzato:

- perché non adatto al sequenziamento automatico
- perché utilizza composti chimici dannosi alla salute



# Il metodo Sanger (o metodo a terminazione di catena)



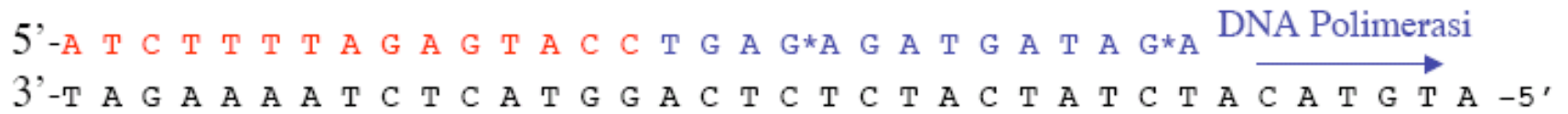
(premio Nobel  
nel 1980)

Il sequenziamento a terminazione di catena si basa sulla sintesi di nuovi filamenti di DNA, complementari ad uno stampo a singolo filamento



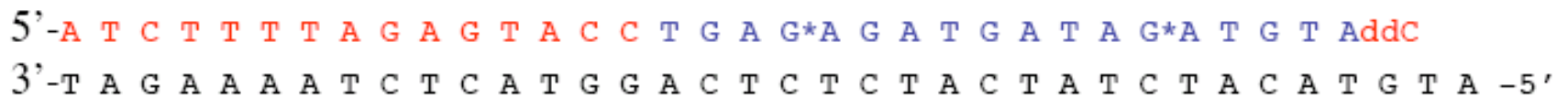
La sintesi del filamento complementare, tuttavia non prosegue indefinitamente, perché la miscela di reazione contiene, in quattro distinte reazioni piccole quantità di specifici **dideossi nucleotidi trifosfati**, ddATP, ddTTP, ddCTP e ddGTP, che bloccano l'allungamento perché posseggono un solo atomo di idrogeno al posto del gruppo -OH in 3'

## PRIMER

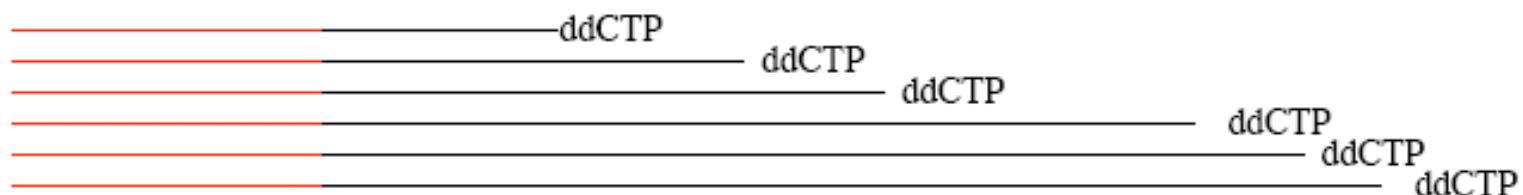


+ ddNTP ( per es. ddCTP)

STOP

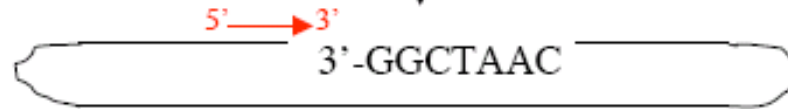
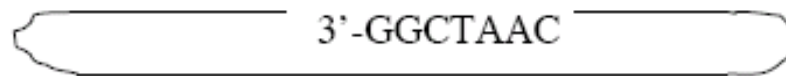


Il risultato è una serie di frammenti interrotti ciascuno in corrispondenza di ogni dCTP



# Schema di sequenziamento a terminazione di catena

DNA stampo a  
singola elica



Ibridazione con  
Il primer

+

[<sup>35</sup>S]dATP+dCTP,dGTP,dTTP(dNTP)+Sequenasi

↓  
ddATP, dNTP

↓  
ddCTP, dNTP

↓  
ddGTP, dNTP

↓  
ddTTP, dNTP

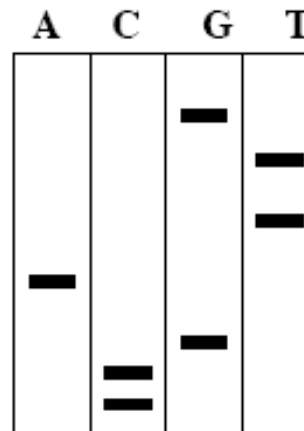
— -CCG ddA

— -ddC  
— -C ddC

— -CC ddG  
— -CCGATT ddG

— -CCGA ddT  
— -CCGAT ddT

-CCGATT ddG  
-CCGAT ddT  
-CCGA ddT  
-CCG ddA  
-CC ddG  
-C ddC  
-ddC

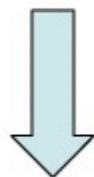
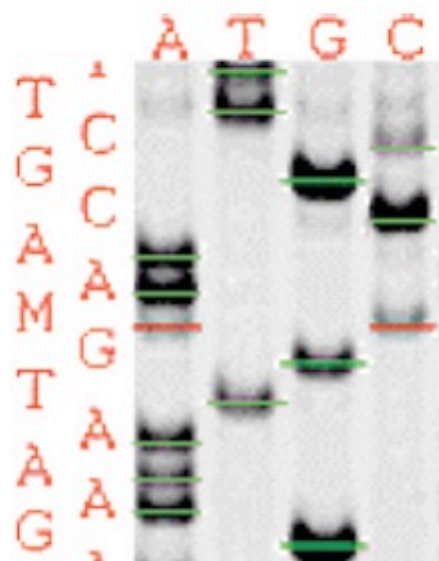


G  
T  
T  
A  
G  
C  
C

↑  
Direzione di  
lettura

Sequenza: 5'-CCGATTG

Per ogni campione si eseguono 4 reazioni separate  
(una per ogni ddNTP)



L'uso di 4 corsie aumenta la variabilità di corsa



# SEQUENZIATORI AUTOMATICI

- ✓ Uno dei più importanti sviluppi nel sequenziamento del DNA, è stata l'introduzione di apparecchiature automatiche per l'elettroforesi e l'analisi dei prodotti di sequenza
- ✓ Una regione di circa 500 bp può essere sequenziata di routine in una singola reazione

## Sequenziamento automatico con marcatori fluorescenti

Unica reazione ed unica corsa

Ad ogni nucleotide è associata una diversa colorazione:

ddATP

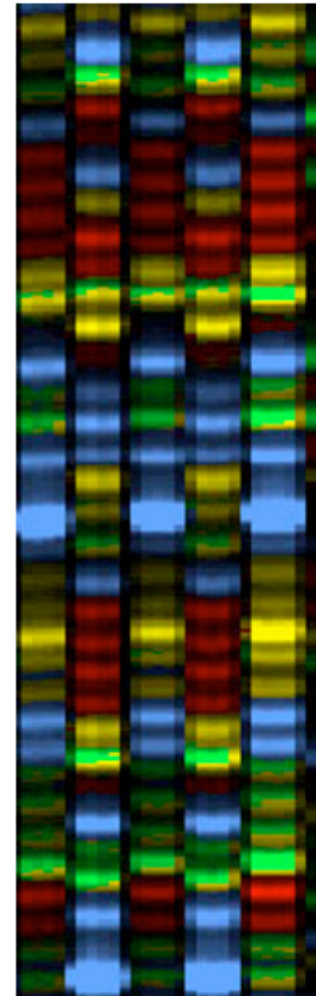
ddTTP

ddGTP

ddCTP

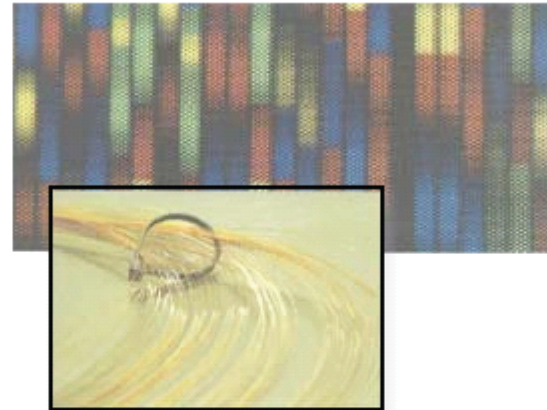
Questo sistema aumenta la produttività  
ed elimina la variabilità di corsa

Coniugando a ciascun ddNTP un diverso marcatore fluorescente, è possibile effettuare le quattro reazioni di sequenziamento in un unico tubo da saggio e caricare il tutto in un solo pozzetto di gel

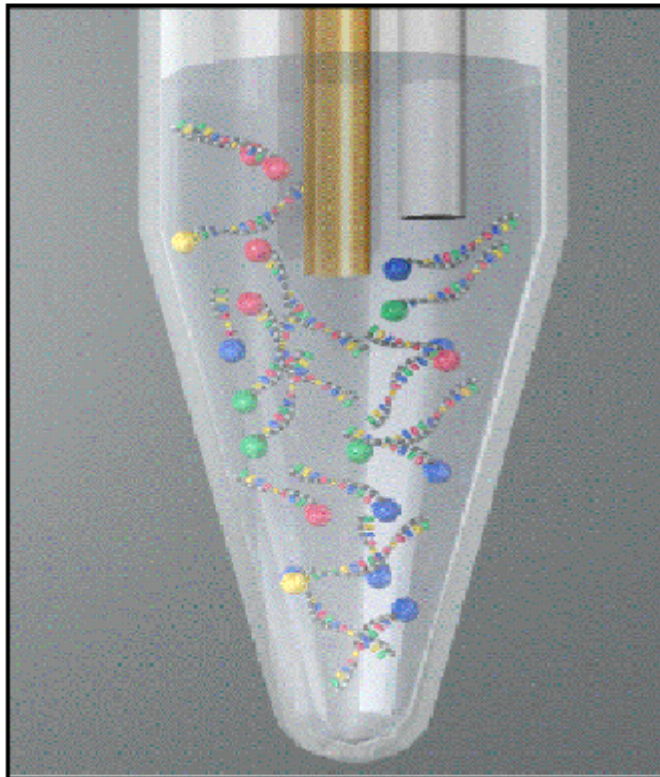


## Sequenziatori Capillari

- ★ l'intervento dell'operatore è minimo
- ★ il sistema carica automaticamente il capillare con il polimero di corsa
- ★ esegue la separazione elettroforetica
- ★ i frammenti marcati di DNA vengono rilevati man mano che attraversano il capillare

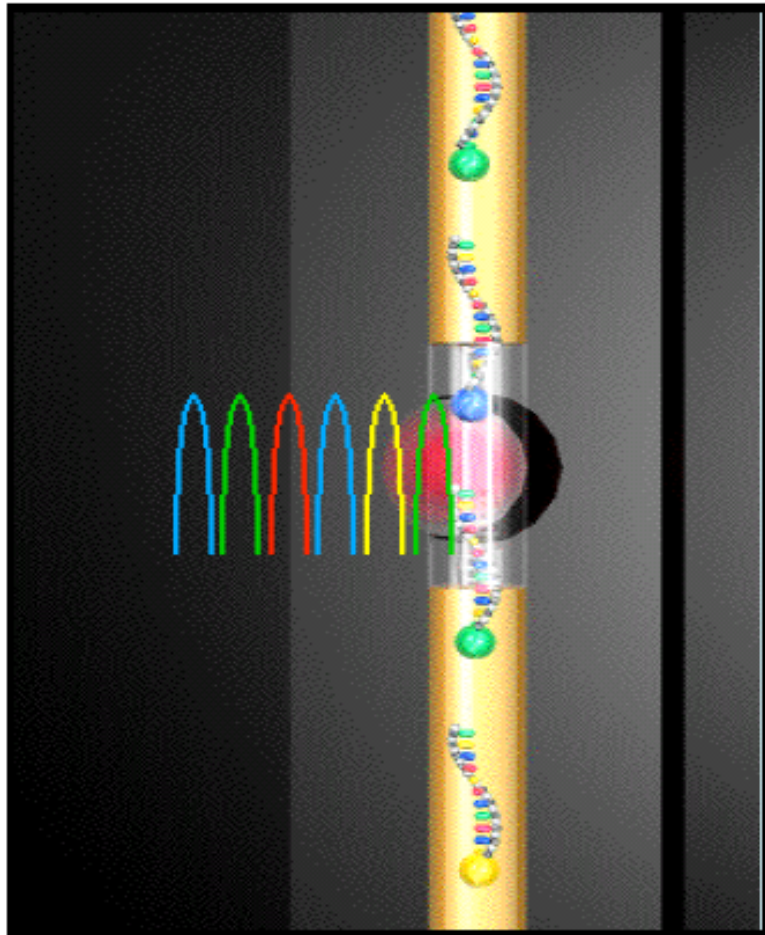


# Electrokinetic Injection & Electrophoresis

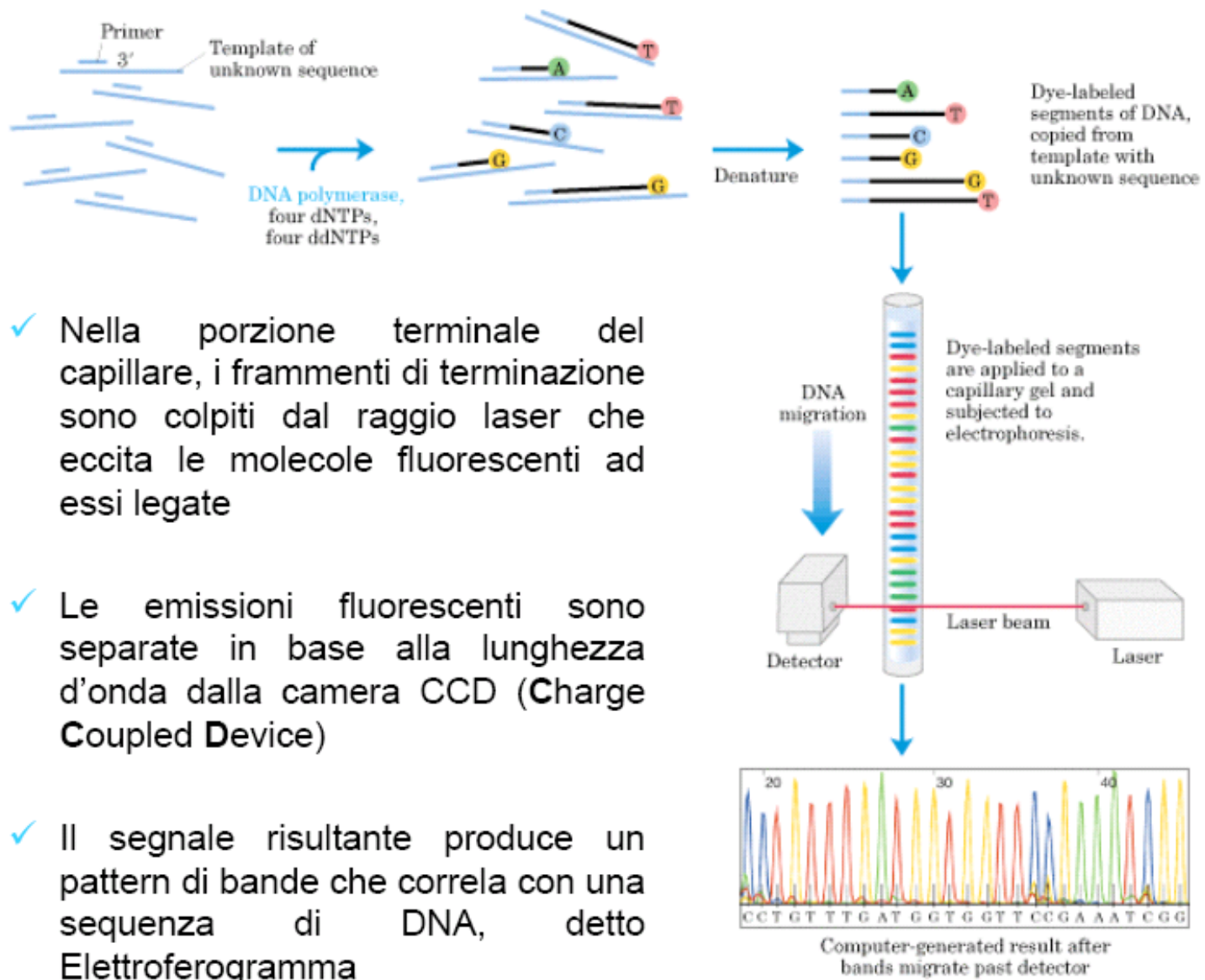


- Capillary and electrode are placed into the sample
- Voltage is applied
- Charged DNA enters in the capillary and it migrates toward the electrode

# Fluorescence Excitation & Detection



- DNA fragments labeled with one of up to five different dyes electrophorese past the laser
- Laser excites dyes causing them to emit light at wavelengths longer than that of the laser
- Emitted light is collected by a CCD camera
- Software converts pattern of emissions into coloured peaks

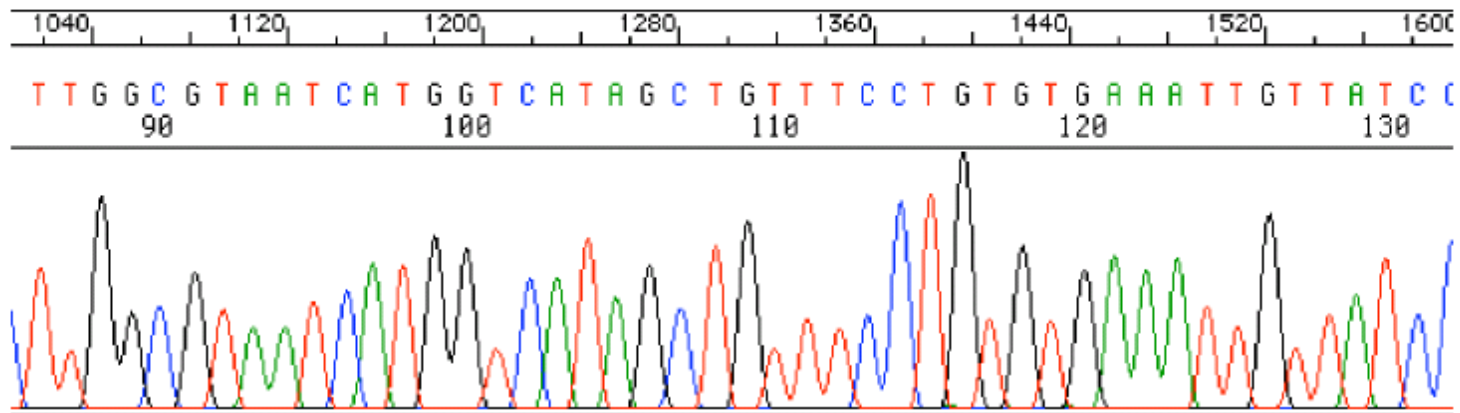


- ✓ Nella porzione terminale del capillare, i frammenti di terminazione sono colpiti dal raggio laser che eccita le molecole fluorescenti ad essi legate
- ✓ Le emissioni fluorescenti sono separate in base alla lunghezza d'onda dalla camera CCD (Charge Coupled Device)
- ✓ Il segnale risultante produce un pattern di bande che correla con una sequenza di DNA, detto Elettroferogramma

## Dal cycle sequencing all'elettroforetogramma...

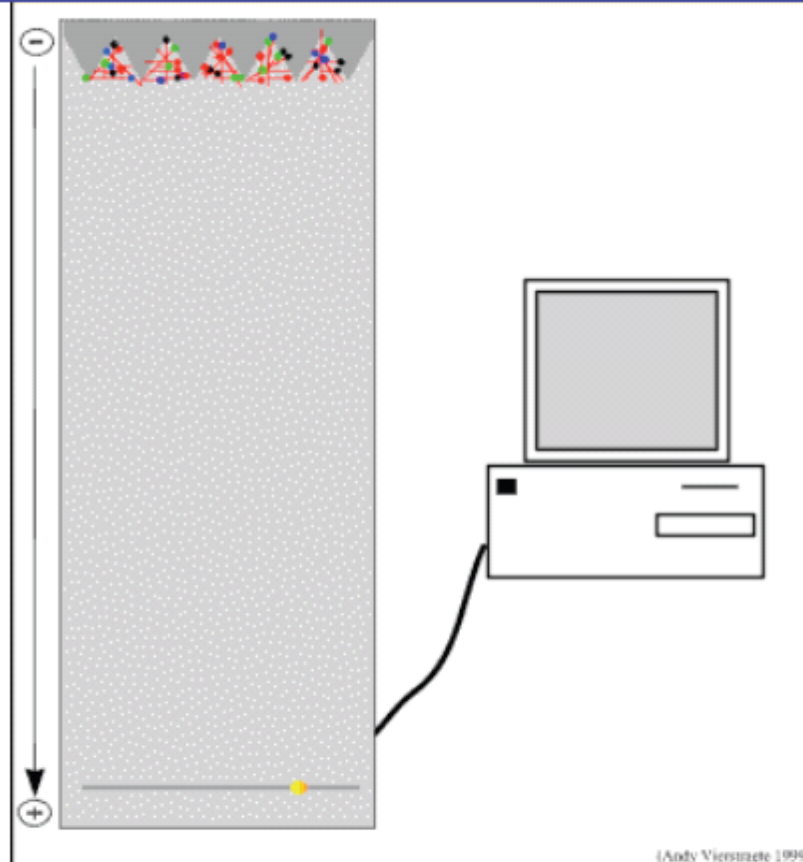
Le emissioni fluorescenti vengono captate da un rilevatore

Le informazioni vengono trasformate in picchi di colore diverso, con aree proporzionali all'intensità di emissione.





# Elettroforesi capillare



(Andy Vierstraete 1999)

- ✓ separa frammenti che differiscono fra loro per un singolo nucleotide
- ✓ i frammenti più piccoli migreranno più rapidamente

# The Dideoxy Method

- Is good only for 700-900bp reactions
- Expensive
- Takes a while
- The human genome is about 3 billion bp

- 96 samples
- 800 nt / sample
- 1,600,000 nt / day

Human genome:  
3,000,000,000 bp  
Minimum coverage for an  
accurate analysis: 8X =  
24,000,000,000 nt

$$\frac{24,000,000,000}{1,600,000} = 15,000 \text{ days}$$

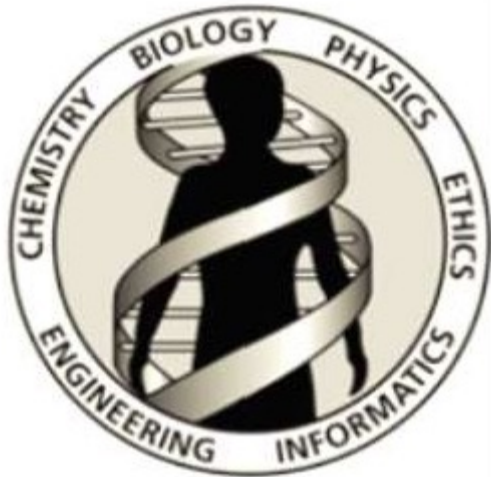




Whitehead Institute, Center for Genome Research, Cambridge, MA

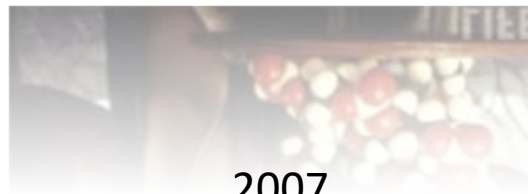
# Sequencing the Human Genome

## Human Genome Project



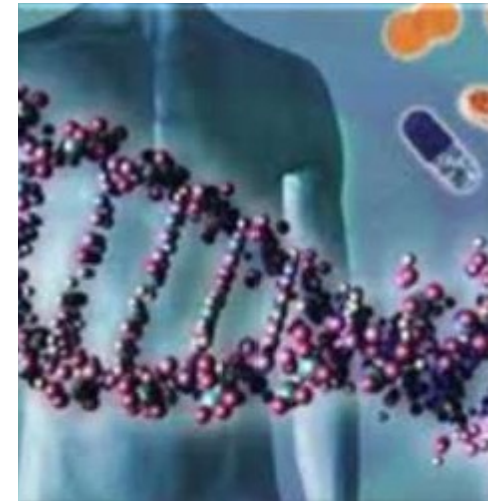
1988 – 2001  
13 years  
3.000.000.000 dollars

## James Watson



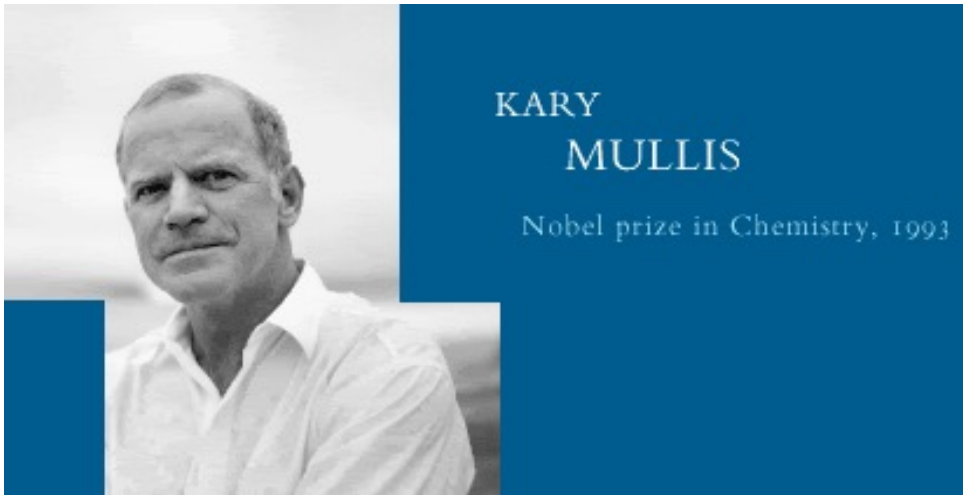
2007  
2 months  
2.000.000 dollars

## Personal genome

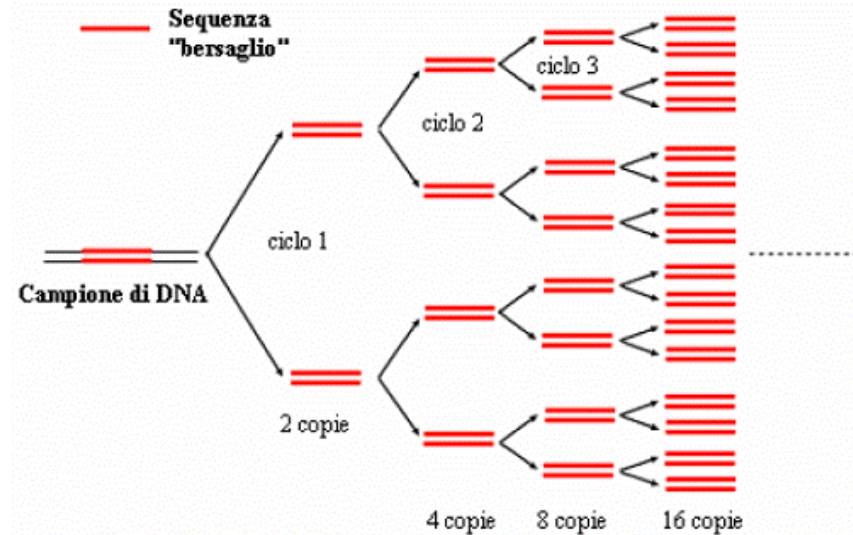


2010  
7 days  
10.000 dollars

# Reazione a Catena della polimerasi

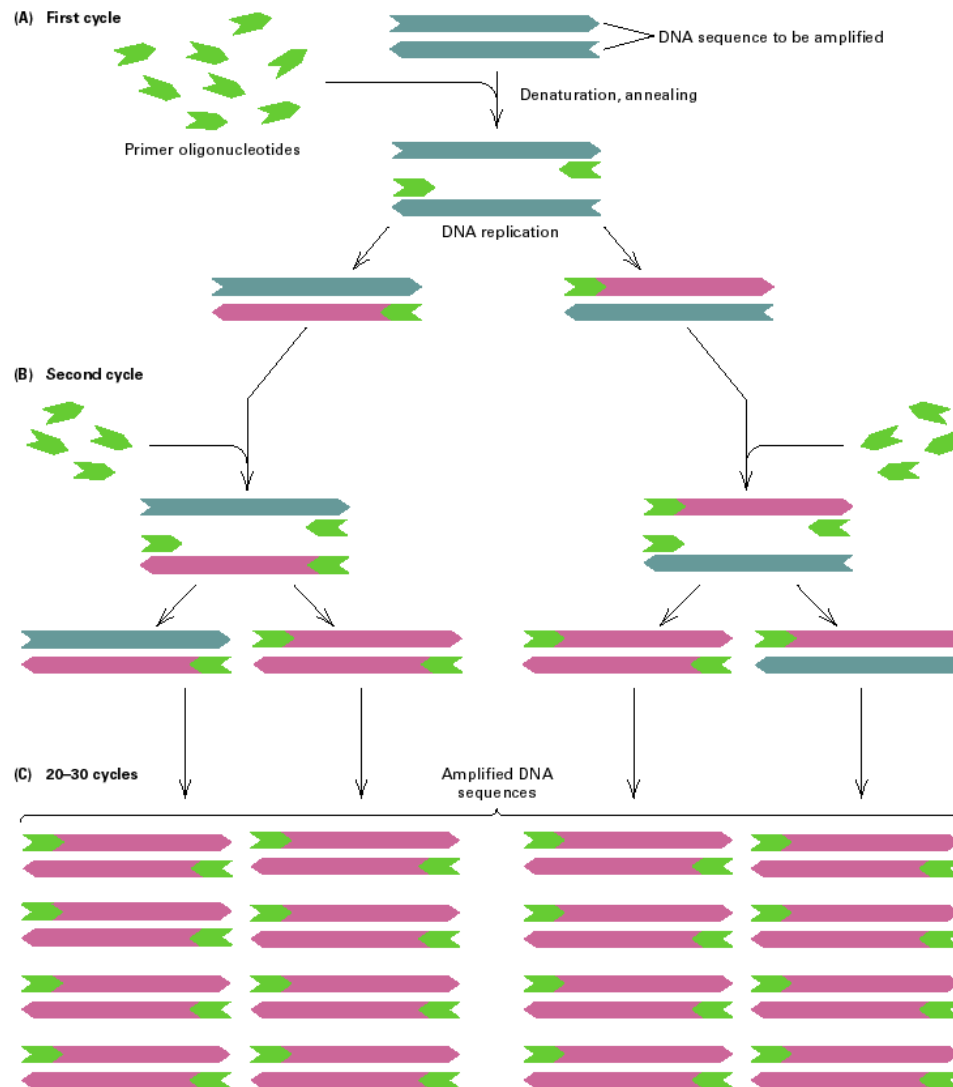


1985 – Kary Mullis



# PCR: Polymerase Chain Reaction

## Reazione a catena della polimerasi



## Step 1. Denaturation

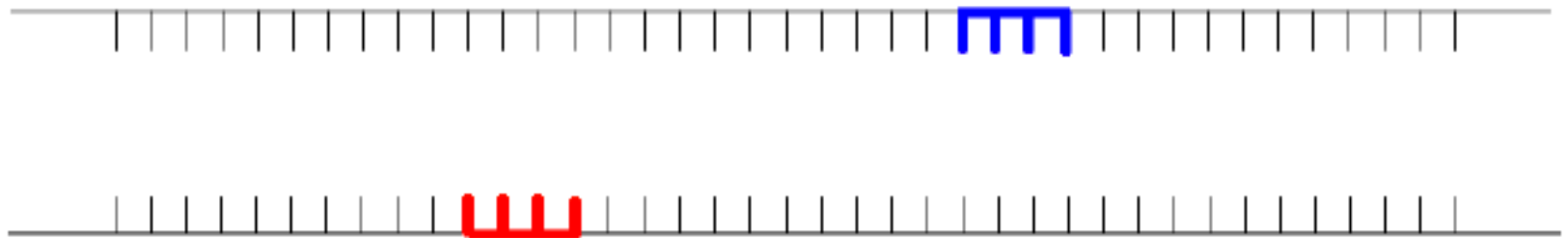


Raise temperature to 94°C  
to separate the duplex form  
of DNA into single strands



## Design primers

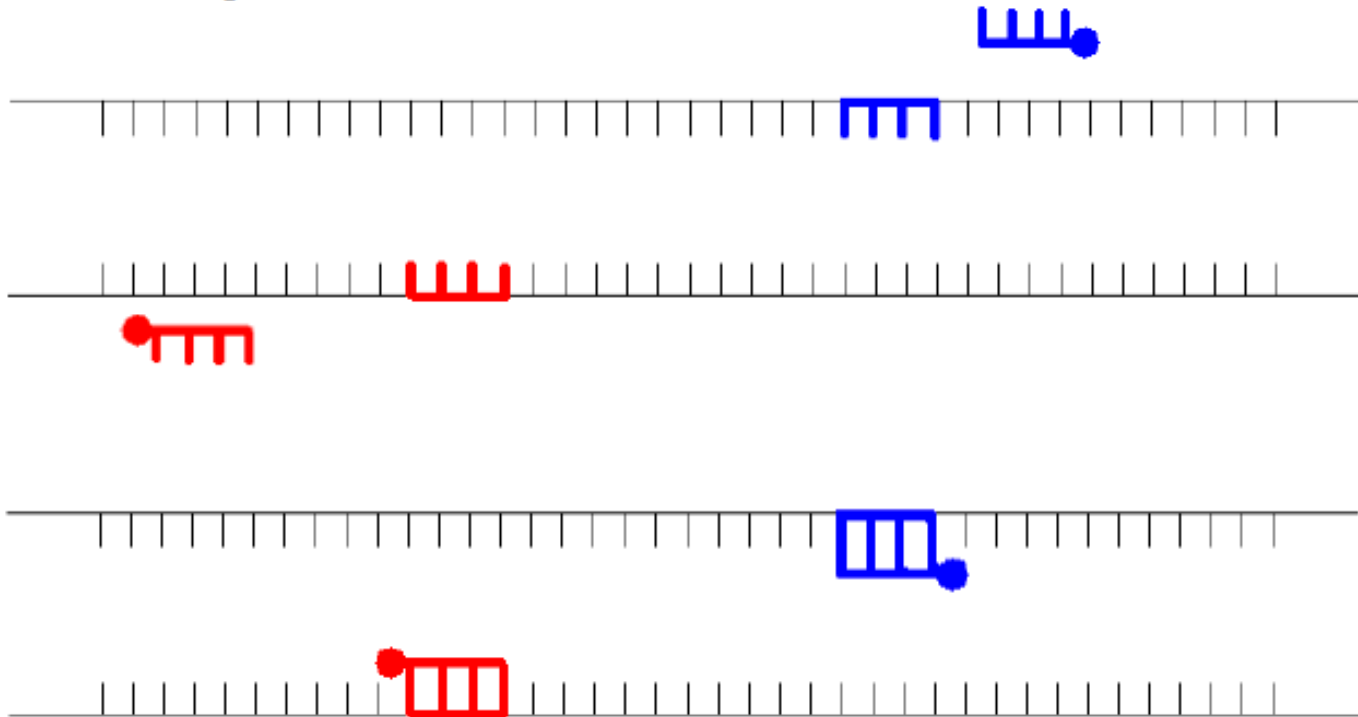
- To perform PCR, a 10-20bp sequence on either side of the sequence to be amplified must be known because DNA pol requires a primer to synthesize a new strand of DNA





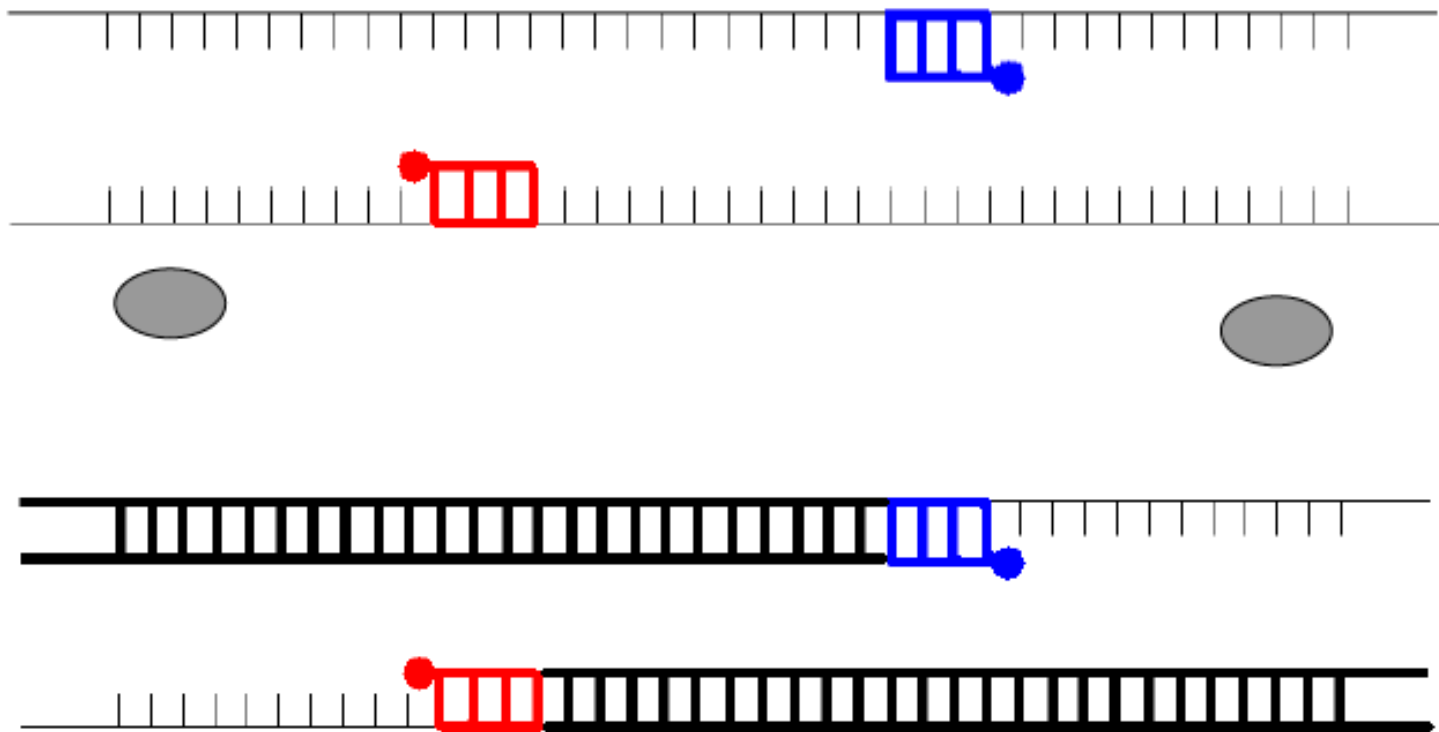
## Step 2. Annealing

- Anneal primers at 50-65°C



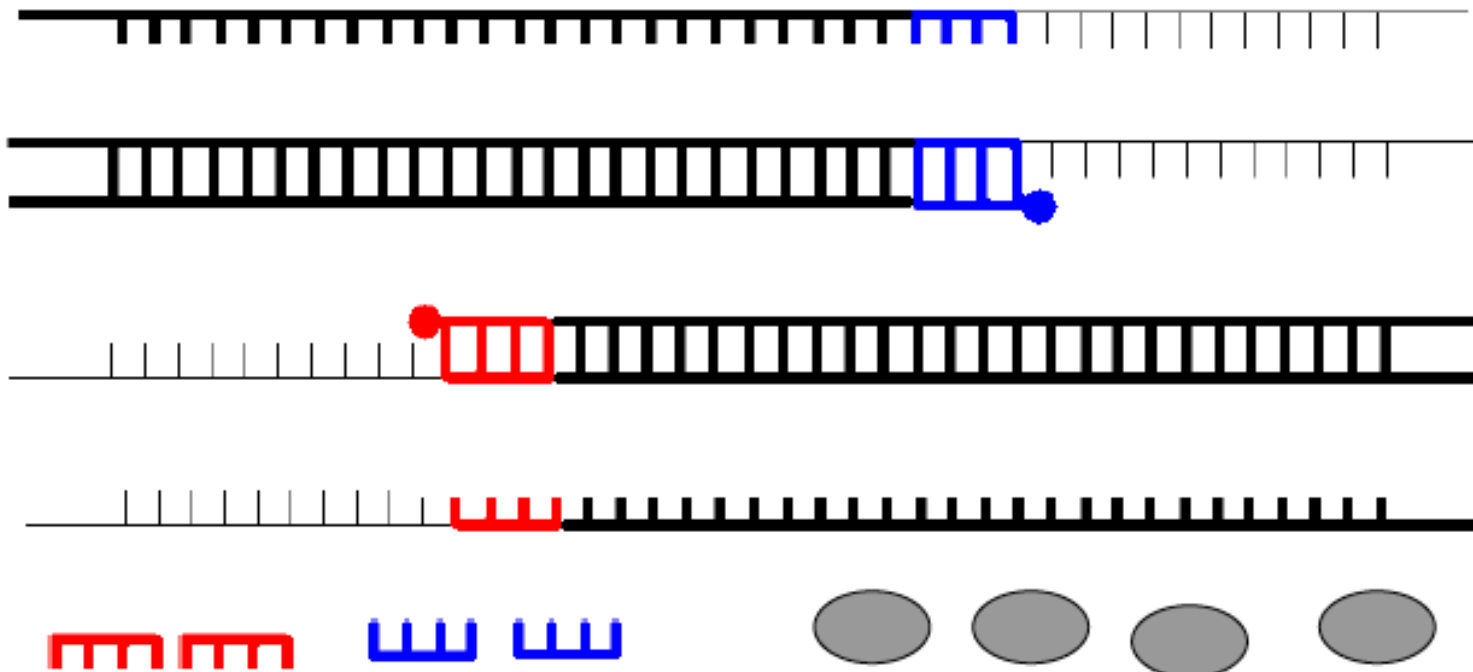
### Step 3. Extension

- Extend primers: raise temp to 72°C, allowing Taq pol to attach at each priming site and extend a new DNA strand



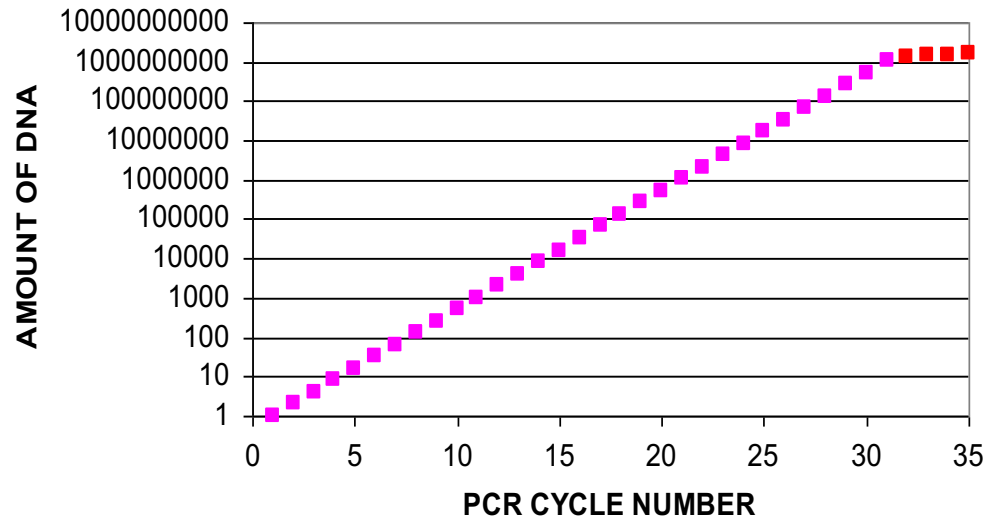
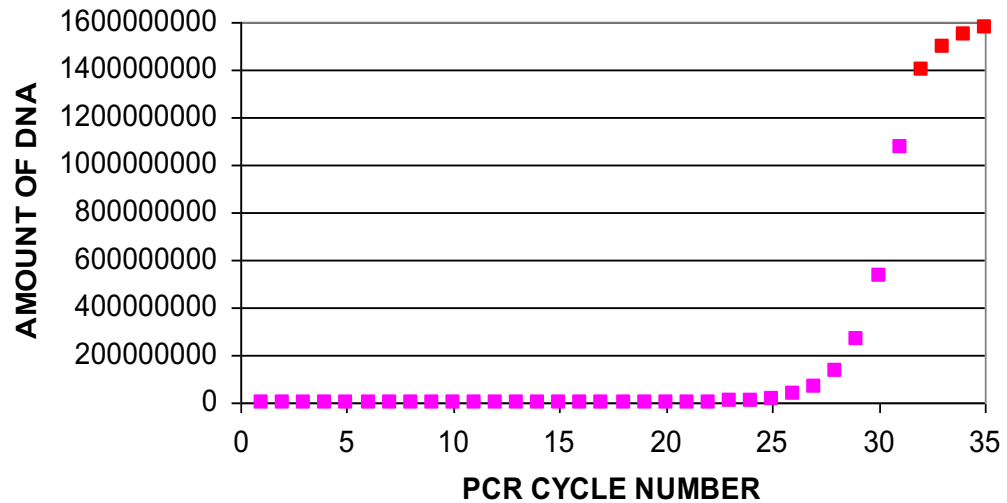
# Repeat

- Repeat the Denature, Anneal, Extension steps at their respective temperatures...



# Rivediamo La PCR...

CYCLE NUMBER	AMOUNT OF DNA
0	1
1	2
2	4
3	8
4	16
5	32
6	64
7	128
8	256
9	512
10	1,024
11	2,048
12	4,096
13	8,192
14	16,384
15	32,768
16	65,536
17	131,072
18	262,144
19	524,288
20	1,048,576
21	2,097,152
22	4,194,304
23	8,388,608
24	16,777,216
25	33,554,432
26	67,108,864
27	134,217,728
28	268,435,456
29	536,870,912
30	1,073,741,824
31	1,400,000,000
32	1,500,000,000
33	1,550,000,000
34	1,580,000,000



# Is Sanger sequencing dead?

ABI 3730XL



< 90 kb/run

Next Gen  
short read instrument  
(Illumina)



“When quantity  
matters  
but length doesn’t”

600 Gb/run

Next Gen  
long read instrument  
(454)



“When length  
matters”

1 Gb/run

# Next Generation Sequencing technology

**454/Roche GS-20/FLX**  
(Oct 2005)



**ABI SOLiD**  
(Oct 2007)



**Illumina/Solexa**  
**Genome Analyser** (Feb 2007)



# The Human Genome

## How fast is the cost going down?

- 2006: \$ 50 million
- 2008: \$500,000
- 2009: \$50,000
- 2010: \$20,000
- 2011: \$5,000
- 2015: \$1,000
- 2020: \$ 250



*"The locket contains a strand of my DNA."*