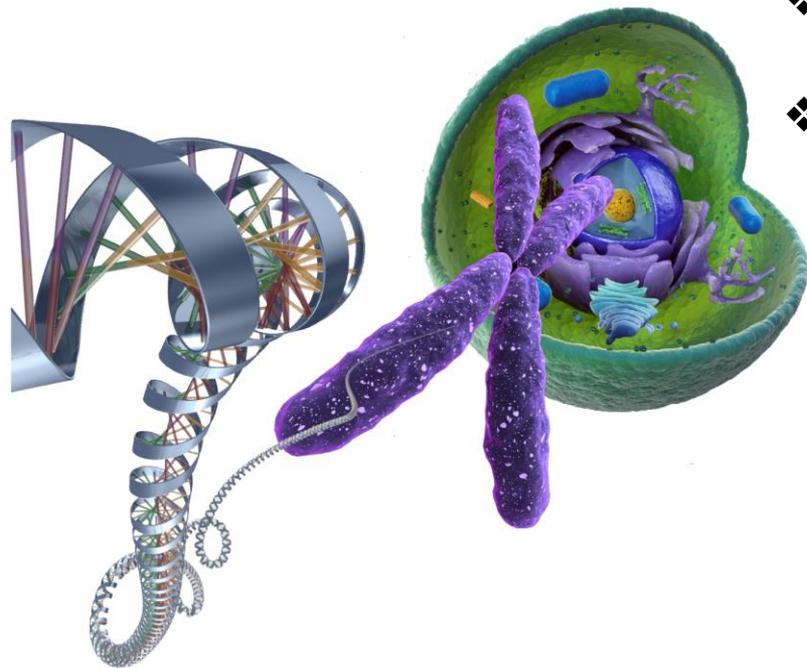

Sequenciamento do DNA e suas aplicações

Prof. Dr. Júlio César Borges

Alunos: Anderson da Silva Aguiar
Bárbara Vieira Pinto
Edvair Paula Moreira Filho

Instituto de Química de São Carlos - IQSC
Universidade de São Paulo - USP

Introdução



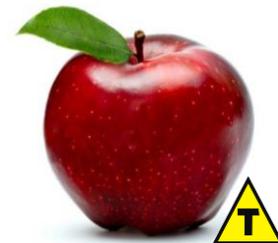
❖ Importância

❖ Projeto Genoma Humano

➤ 10/06/99 - 14/04/03

➤ 1000 membros de 50 países para coordenar o projeto

➤ Sequenciar 23 pares de cromossomos



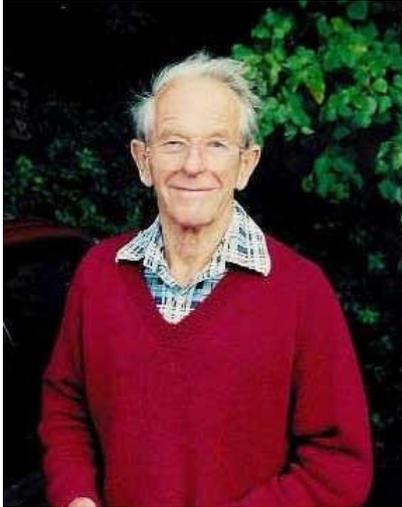
Métodos para sequenciamento de DNA

1ª Geração: Método enzimático - Frederik Sanger (1980)

2ª Geração: Método de pirosequenciamento - Mostafa Ronaghi (1996)

3ª Geração: *Single Molecule Real Time (SMRT) - DNA Sequencing*

Método de Sanger (1980)



Frederick Sanger



Walter Gilbert



Paul Berg

- ❖ Técnica utilizada no Projeto Genoma Humano
- ❖ Frederick Sanger recebeu o Nobel de Química de 1958, por ter determinado a estrutura molecular da insulina. Juntamente com Walter Gilbert e Paul Berg, recebeu novamente o Nobel de Química de 1980, por estudos sobre o DNA.

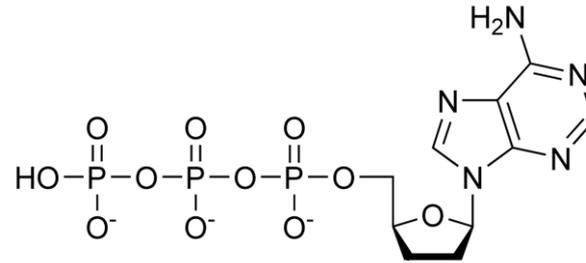
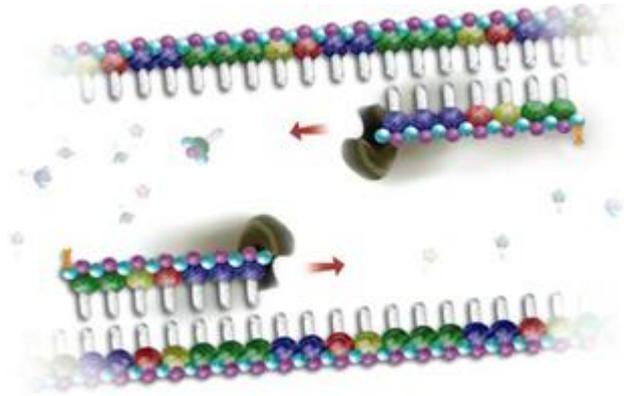
Método de Sanger (1977)



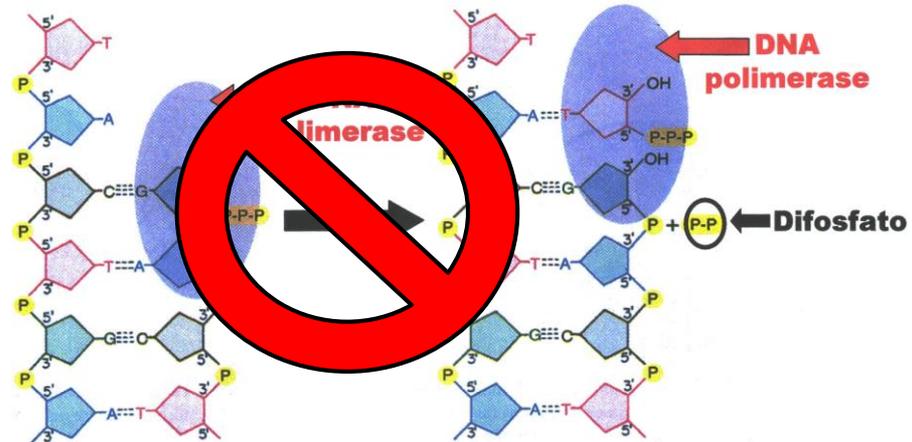
- ← DNA
- ← Enzima (Taq Pol)
- ← Primer
- ← dATP (desoxiadenosina trifosfato)
- ← dTTP (desoxitimidina trifosfato)
- ← dCTP (desoxicitosina trifosfato)
- ← dGTP (desoxiguanosina trifosfato)
- ← ddNTP (dideoxinucleotideotrifosfato)



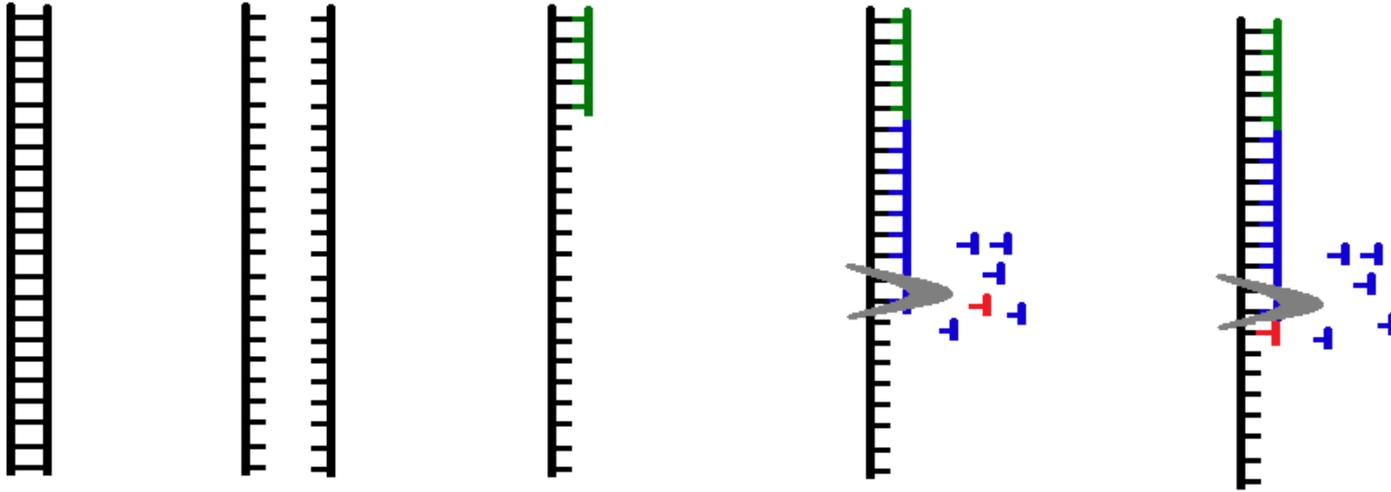
Método de Sanger (1977)



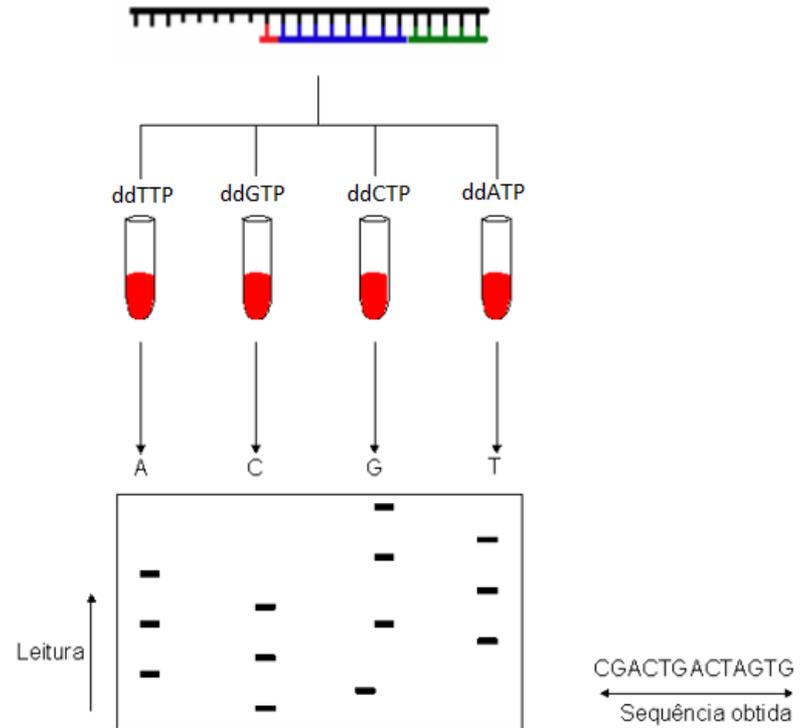
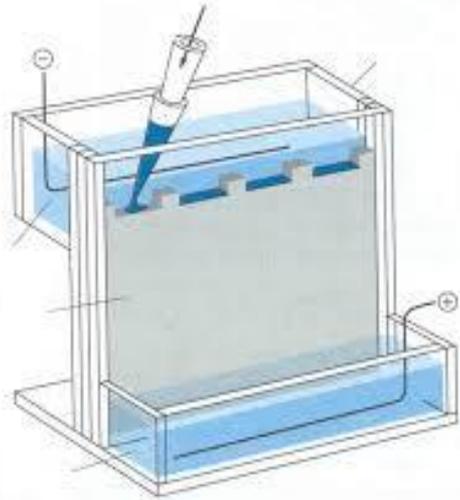
ddATP



Método de Sanger (1977)

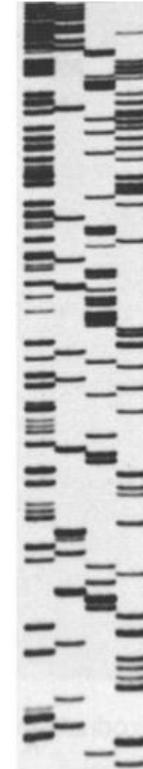
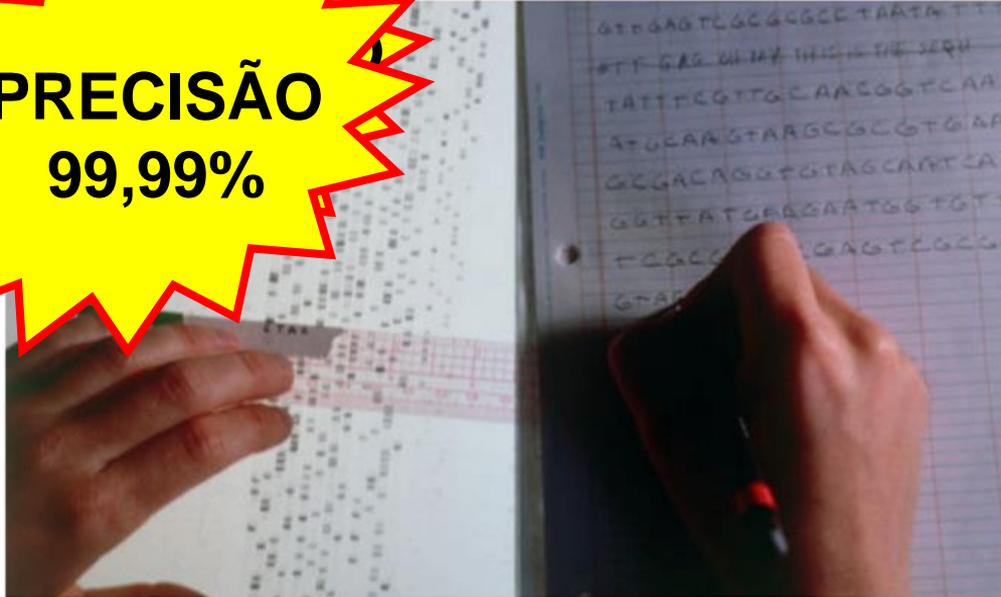


Método de Sanger (1977)



Método de Sanger (1977)

**PRECISÃO
99,99%**



Pirosequenciamento - Método de Síntese

- Proposto por Mostafa Ronaghi primeiramente em 1996.
- 2ª geração de sequenciamento do DNA - primeira alternativa ao método descrito por Sanger.



Mostafa Ronaghi (1968)

Kungliga Tekniska Högskolan



Método

- Baseado no princípio de detecção dos raios luminosos emitidos dos diferentes PPI liberados a partir da síntese do DNA.

Utiliza 4 enzimas:

DNA
polimerase

ATP
sulforilase

Luciferase

Apirase

Vídeo ilustrando o processo de pirosequenciamento:

<https://www.youtube.com/watch?v=bNKEhOGvcaI>

Desafios

1. Apenas pequenos pedaços de DNA eram sequenciados.

a. Inibição da pirase por dATP- α -S (dATP- α -S Sp e dATP- α -S Rp)

2. Forma do *primer* para PCR e para o sequenciamento

a. Ligação do dNTP complementar pode ser inibida quando ocorrem complicações frente ao primer-molde (auto-looping, dímeros e hibridização cruzada).

b. Recomendável o primer de sequenciamento ser adicionado antes do primer para o PCR, a fim de rotular a cadeia de DNA adequada.

Desafios

3. *de novo* sequenciamento de DNA heterozigótico (polimorfismo)

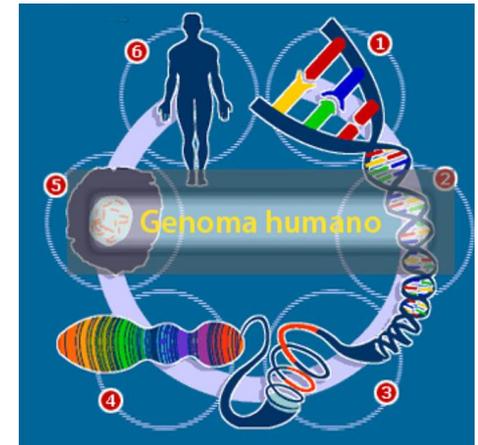
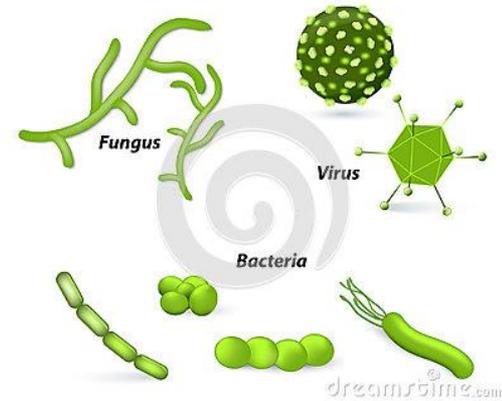
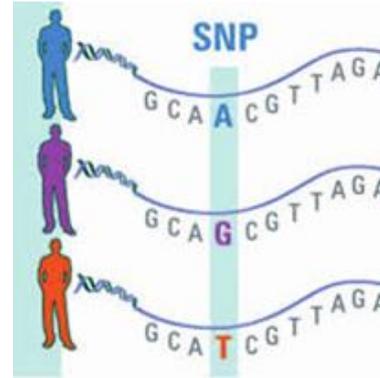
- a. Resultado de uma substituição - possível obter uma extensão sincronizada depois do nucleotídeo substituído.
- b. Resultado de uma deleção ou inserção de mesmo tipo de nucleotídeo adjacente - possível obter uma extensão sincronizada.
- c. Resultado de uma deleção ou inserção de nucleotídeo diferente - pode-se tornar fora de fase deixando difícil a interpretação da sequencia subsequente.
 - i. Polimorfismo conhecido - Possível usar programação de disponibilização de nucleotídeo.

Desafios

4. Determinação do número de nucleotídeos na região homopolimérica - resposta não linear da luz acima de 5-6 nucleotídeos idênticos
 - a. É possível adicionar 10 ou menos nucleotídeos adjacentes idênticos na presença de apirase
 - i. Software específico que integre os sinais → saber quantos nucleotídeos foram adicionados.

Aplicações

- Polimorfismo de nucleotídeo único (SNP);
- Identificação de bactérias;
- Tipagem fúngica e viral;
- Detectar mutações;
- Análises de metilação do DNA;
- Sequências múltiplas;
- Verificações de clones;
- Sequenciamento do genoma humano.



Prós

1. Pode ser automatizada
2. Expediente (1dia)
3. Alto Rendimento
4. **Comprimento das sequências podem ser tão longo quanto >200pb**
5. Ilimitado número de amostras
6. Incorporação simples em protocolos PCR
7. Simples dados de frequência
8. Rápido método com real tempo de leitura altamente adequado para sequenciamento de pequenas faixas de DNA
9. **Pode gerar o sinal de sequenciamento imediatamente a partir do primer**
10. Preparação de amostra e fita simples de DNA é relativamente rápido
11. **O custo do reagente é menor para pequenas faixas de DNA quando comparado ao de outros métodos disponíveis.**



Contras

- 1. Alto Custo**
2. Rápidas leituras para inferência filogenética
- 3. Pesada bioinformática**
- 4. Relativamente alta taxa de erro (0,0098)**
5. Longo dNTP único não confiável (linearidade 8 pb)
6. Primers que apresentam longas fusões podem levar tendências aos resultados.



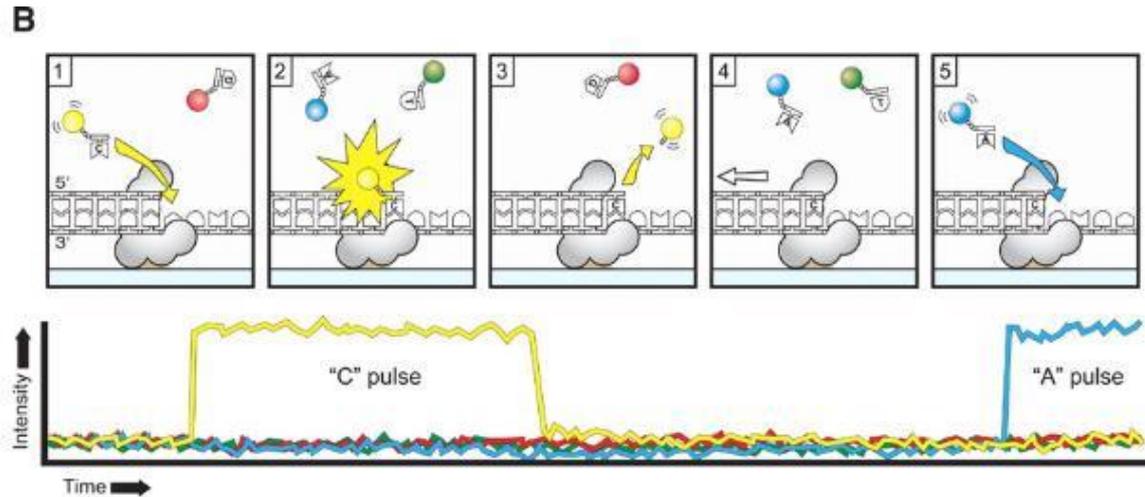
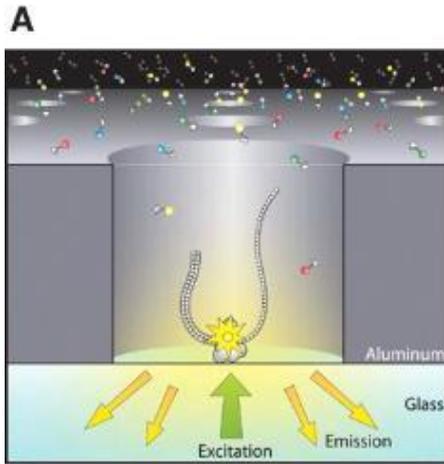
Single-molecule, Real Time DNA sequence (SMRT)

- Desenvolvido pela Pacific Bioscience (PacBio);
- Sequenciamento de terceira geração;
- PacBio RS de primeira e segunda geração;
- Método de síntese em tempo real;



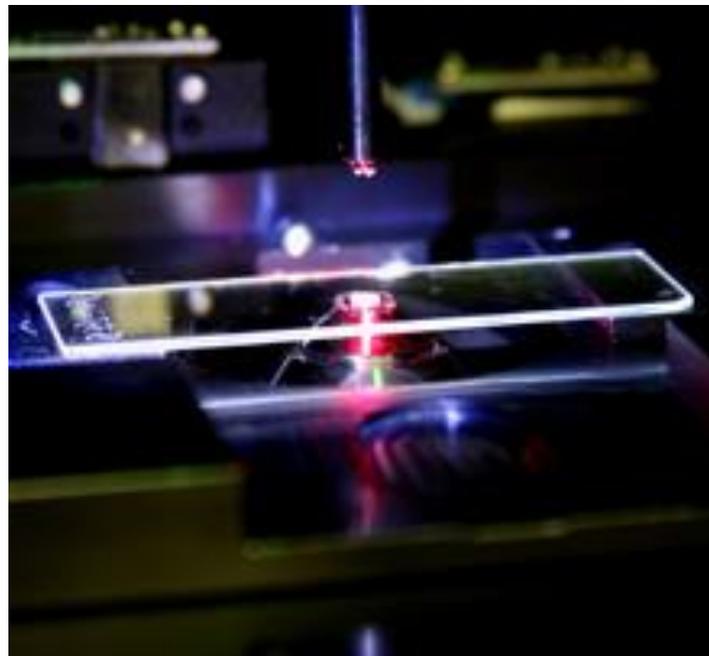
SMRT- Funcionamento

- DNA polimerase fixa no fundo de zero-move waveguide (ZMW);
- Fita de DNA acoplada a enzima;



SMRT - Aplicação

- Sequenciamento completo de genoma de vírus e bactérias;
- Metilações (DNA transmetilases). Mudanças epigenéticas;



SMRT- Prós

- Realiza leituras de longo comprimento (até 20 kbp);
- Precisão de 99,999%;
- Alta qualidade de sequenciamento;
- Comprimento de leitura diminui gastos com outras análises;
- Análises rápidas (2h);
- Não precisa clonar o DNA;



SMRT- Contras

- Alto custo do equipamento;
- Alto custo de medições;
- Requer alta massa de DNA (1 μ g);

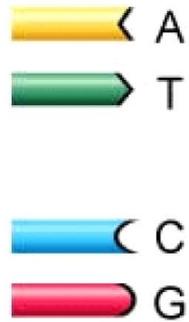
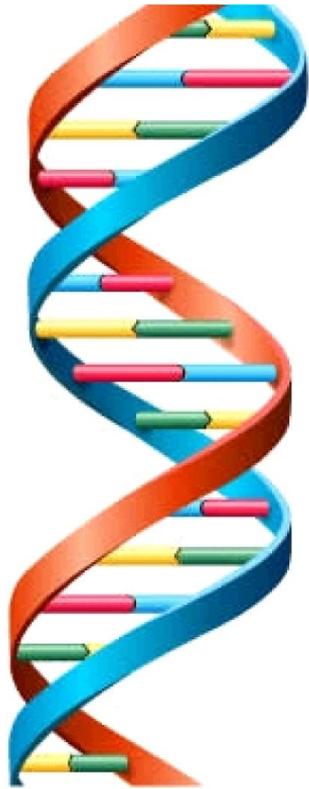


Conclusão

- Evolução rápida dos métodos de sequenciamento;
- Praticidade cada vez maior;
- Aplicações para pesquisa e indústria;

Referências

- Fakruddin, MD.; Chowdhury, A.; Hossain, MD. N.; Mannan, K. S. B.; Muzamdar, R. M. Pyrosequencing – Principles and Applications, **Internacional Journal of Life Science and Pharma Research**, Vol. 2, p. L.65-75, 2012
- <http://www.spq.pt/magazines/BSPQ/533/article/3000111/pdf>
- http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p_do06.pdf
- <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CENARGEN/24105/1/ct022.pdf>
- Peixoto, B. M. Classificação de sequencia e análise de diversidade em metagenômica, **Tese mestrado**, Universidade Estadual de Campinas/UNICAMP - Instituto de Computação, 2013.
- <http://www.illumina.com/techniques/sequencing/dna-sequencing/whole-genome-sequencing/de-novo-sequencing.html>
- Quail, M., Smith, M. E., Coupland, P., Otto, T. D., Harris, S. R., Connor, T. R., ... Gu, Y. (2012). A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion torrent, pacific biosciences and illumina MiSeq sequencers. *BMC Genomics*, 13(1), 1. <http://doi.org/10.1186/1471-2164-13-341>;
- Roberts, R. J., Carneiro, M. O., & Schatz, M. C. (2013). *The advantages of SMRT sequencing*. *Genome biology*, 14(6), 405.
- Stadermann, K. B., Weisshaar, B., & Holtgräwe, D. (2015). *SMRT sequencing only de novo assembly of the sugar beet (Beta vulgaris) chloroplast genome*. *BMC Bioinformatics*, 16(1), 295.
- Minoche, A. E., Dohm, J. C., Schneider, J., Holtgräwe, D., Viehöver, P., Montfort, M., ... Himmelbauer, H. (2015). *Exploiting single-molecule transcript sequencing for eukaryotic gene prediction*. *Genome Biology*, 1–13.



MUITO OBRIGADO PELA
ATENÇÃO