



Sekwencjonowanie DNA

- Wprowadzenie
- Przeczytaj
- Wirtualne laboratorium (WL-I)
- Sprawdź się
- Dla nauczyciela



Sekwencjonowanie DNA

Sekwencja DNA zapisywana jest w postaci ciągu liter (ATTTGCAAGGCCCTC). Zapis ten przypomina tekst książki. Spisany w ten sposób genom bakterii *Escherichia coli* zajmuje niemal 300 stron, a genom człowieka – aż 200 000 stron!

Źródło: National Human Genome Research Institute, Flickr, licencja: CC BY 2.0.

Opracowanie w latach 70. XX w. metod sekwencjonowania DNA było milowym krokiem w rozwoju inżynierii genetycznej. Bardzo szybko tę nową metodę wdrożono, ulepszając istniejące już dziedziny nauki. Metoda ta obecnie jest szeroko wykorzystywana zarówno w medycynie, jak i innych dziedzinach nauki. Sekwencjonowanie DNA sprawiło, że udało się określić podłoże wielu chorób genetycznych, a także zidentyfikować szereg mikroorganizmów. Rola sekwencjonowania jest nieoceniona, a nowe narzędzia oparte na analizie sekwencji DNA wpływają znacząco na wiele aspektów naszego życia.

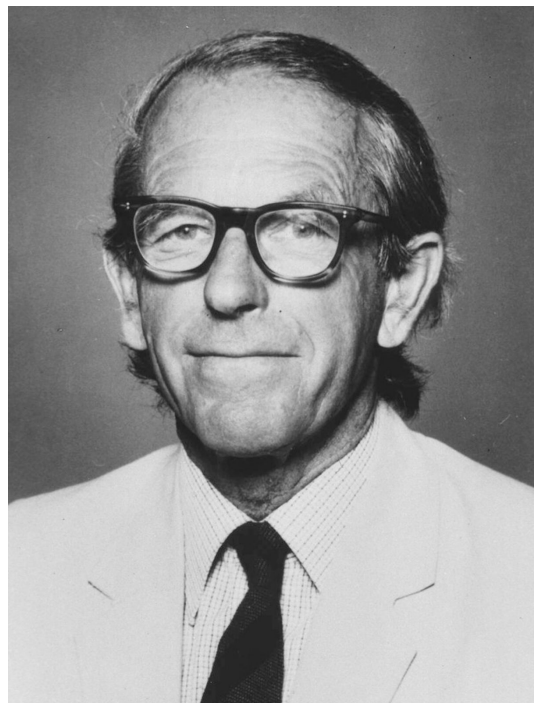
Twoje cele

- Scharakteryzujesz pierwsze techniki sekwencjonowania DNA.
- Przedstawisz istotę sekwencjonowania DNA metodą Sangera.
- Wymienisz możliwości zastosowania sekwencjonowania DNA.
- Przeprowadzisz doświadczenie polegające na zsekwencjonowaniu genu łańcucha beta hemoglobiny metodą Sangera.

Przeczytaj

Sekwencjonowanie DNA jest jedną z podstawowych metod genetyki molekularnej, polegającą na odczytywaniu kolejności nukleotydów w nici DNA. Pierwszym osiągnięciem w tej dziedzinie było poznanie sekwencji „[lepkiego końca](#)” DNA bakteriofaga λ przez **Raya Wu** w **1968** r. Naukowiec ten został nazwany „ojcem sekwencjonowania DNA”. W 1977 r. zostały wprowadzone dwie metody sekwencjonowania DNA:

- Metoda chemiczna - opracowana przez **Allana Maxama i Waltera Gilberta**, nazywana metodą chemicznej degradacji łańcucha DNA (inaczej metodą chemicznego zakończenia łańcucha DNA). Metoda ta polegała na wykorzystaniu radioaktywnego znacznika (izotopu fosforu), który przyłączał się na końcu 5' łańcucha DNA. Następnie prowadzone były reakcje mające na celu modyfikację zasad azotowych nukleotydów, zależnie od wybranych substancji. Modyfikacje te prowadziły do ich oderwania od reszt cukrowych nukleotydu. Efektem było pęknięcie nici DNA za zmodyfikowanym nukleotydem. Mieszaniny reakcyjnie rozdzielano następnie za pomocą elektroforezy.
- Metoda enzymatyczna – bardziej popularna i stosowana do dzisiaj (z modyfikacjami), to metoda terminacji łańcucha opracowana przez **Fredericka Sangera**.



Frederick Sanger, dwukrotny laureat Nagrody Nobla.

Źródło: wikipedia.org, domena publiczna.

Sekwencjonowanie DNA metodą Sangera

Schemat sekwencjonowania DNA metodą Sangera z wykorzystaniem znakowanych fluorescencyjnie dideoksynukleotydów.

Źródło: Englishsquare Sp. z o.o., licencja: CC BY-SA 3.0.

Skład czterech probówek do reakcji sekwencjonowania wygląda następująco:

1. probówka „A”: 4 [nukleotydy](#) → A, C, T, G, ddATP, [polimeraza](#) DNA;
2. probówka „G”: 4 nukleotydy → A, C, T, G, ddGTP, polimeraza DNA;
3. probówka „C”: 4 nukleotydy → A, C, T, G, ddCTP, polimeraza DNA;
4. probówka „T”: 4 nukleotydy → A, C, T, G, ddTTP, polimeraza DNA.

Efektom reakcji jest powstanie dużej liczby fragmentów DNA o różnej długości (**C**), uzależnionej od tego, który nukleotyd został dołączony do nici DNA na jej końcu.

W ostatnim kroku sekwencjonowania przeprowadzana jest [elektroforeza](#), która ma na celu pokazanie nukleotydów terminalnych, czyli znajdujących się na końcu każdej z nici DNA. Po naświetleniu żelu, na którym są rozdzielone nukleotydy każdej z czterech probówek, można uzyskać obraz wyłącznie nukleotydów dołączonych na nowo i pokazać je na chromatogramie (**D**).

Nowe metody sekwencjonowania DNA

Opracowanie chemicznej oraz enzymatycznej metody sekwencjonowania DNA nie zakończyło procesu rozwoju technik sekwencjonowania. Obecnie techniki te są zautomatyzowane i przeprowadzane bez udziału niebezpiecznych związków radioaktywnych. Jedną z nowych metod sekwencjonowania jest tzw. **pirosekwencjonowanie**.

Pirosekwencjonowanie polega na odczytywaniu sekwencji DNA za pomocą elementów światłoczułych. Jest to możliwe dzięki zastosowaniu odpowiednich enzymów, a także substratów reakcji. Matrycę w tej technice stanowi jednoniciowe DNA, do którego przyłączany jest wyznakowany starter. Matrycę inkubuje się następnie z:

- polimerazą DNA – najczęściej wolno syntetyzującą polimerazą z *E. coli*;
- sulfurylazą ATP – enzymem pozwalającym na syntezę ATP;
- lucyferazą – enzymem katalizującym przemianę lucyferyny w oksolucyferinę;
- apyrazą – enzymem degradującym wolne nukleotydy;
- adenozy-5' fosfosiarczanem (APS) – substratem do syntezy ATP przez sulfurylazę ATP.

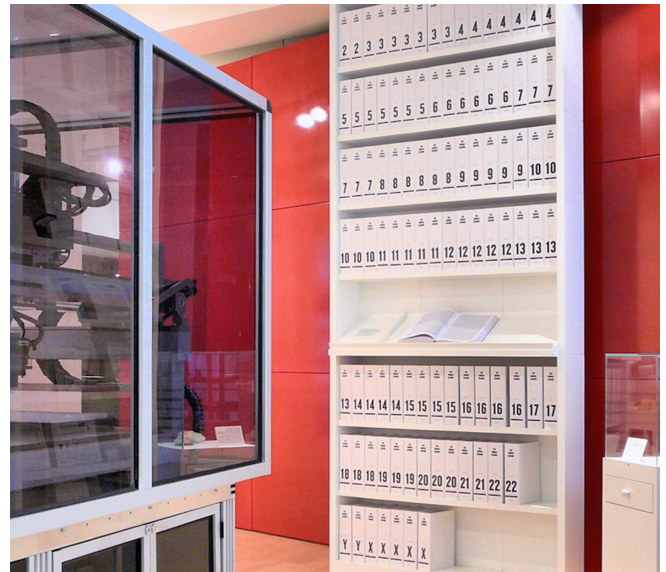
Do mieszaniny dodawany jest pierwszy rodzaj nukleotydów. W wyniku syntezy nici komplementarnej dochodzi do uwolnienia pirofosforanu, w ilości zależnej od ilości przyłączonych nukleotydów. Sulfurylaza ATP prowadzi syntezę ATP z uwolnionego pirofosforanu oraz dostarczonego do mieszaniny reakcyjnej APS. Powstały w ten sposób ATP stanowi źródło energii dla przemiany lucyferyny w oksolucyferinę, katalizowanej przez enzym lucyferazę. Reakcji tej towarzyszy emisja światła, które może być odczytane przez detektor. Wielkość odczytywanych pików jest zależna od ilości przyłączonych nukleotydów, w trakcie syntezy nici. Niewykorzystane nukleotydy są następnie degradowane przez apyrazę. Dopiero po zakończonym procesie degradacji możliwe jest dodanie kolejnego nukleotydu do mieszaniny.

Historia sekwencjonowania DNA

Początkowo sekwencjonowano tylko niewielkie [genomy](#), w tym wirusowe i bakteryjne. W 1994 r. poznano genom wirusa Epsteina-Barr, a pierwszy genom bakteryjny zsekwencjonowano w 1995 r. i był to genom *Haemophilus influenzae*. Poznanie sekwencji genomów wirusowych i bakteryjnych pozwala m.in. na wykazanie ich mechanizmów działania, a także próbę ochrony przed patogennymi mikroorganizmami.

Pierwszym organizmem eukariotycznym, którego sekwencję poznano, były drożdże *Saccharomyces cerevisiae* (w 1996 r.). Dwa lata później zsekwencjonowano genom organizmu wielokomórkowego – nicienia *Caenorhabditis elegans*. Sekwencjonowanie genomów różnych organizmów w znaczący sposób przyczyniło się do poznania genomu człowieka. Sekwencje te stanowiły matrycę do analizy danych uzyskanych podczas sekwencjonowania genomu człowieka. Przyspieszyło to proces składania otrzymanych sekwencji w całość.

Mitochondrialny genom człowieka zsekwencjonowano już w 1981 r., co przyczyniło się do podjęcia próby poznania sekwencji całego genomu człowieka. Wyniki Projektu poznania ludzkiego genomu (ang. Human Genome Project), trwającego od 1990 do 2003 r., opublikowano w 2001 r. Poznanie sekwencji genomu nie stanowiło jednak zakończenia całego procesu. Następnym zadaniem było udzielenie odpowiedzi na pytanie o rolę danych sekwencji, a także ich wpływ na funkcjonowanie genomu. Badania te prowadzone są nadal.



Human Genome Project, projekt mający na celu poznanie sekwencji ludzkiego genomu, trwał w latach 1990–2003.

Źródło: Russ London, wikipedia.org, licencja: CC BY-SA 3.0.

Zastosowanie sekwencjonowania DNA

Sekwencjonowanie DNA jest często wykorzystywane w medycynie, a także biotechnologii i biologii molekularnej. Poznanie sekwencji DNA wybranego organizmu i zawartych w tym fragmencie informacji pozwala na ulepszenie i przyspieszenie diagnostyki chorób, a także bardziej spersonalizowaną terapię. Sekwencjonowanie DNA w medycynie znajduje zastosowanie także przy identyfikacji podłoża chorób nowotworowych.

Sekwencjonowanie jest pomocne także w identyfikacji chorób dziedzicznych, takich jak: mukowiscydoza, fenyloketonuria, choroba Huntingtona. Technika ta znalazła również zastosowanie w nieinwazyjnym badaniu płodu w kierunku potwierdzenia lub wykluczenia występowania u dziecka chorób genetycznych, takich jak zespół Downa czy zespół Edwardsa. W badaniach mikrobiologicznych sekwencjonowanie DNA jest wykorzystywane m.in. do identyfikacji bakterii, których rozpoznanie w warunkach laboratoryjnych jest trudne lub niemożliwe. Dzięki ustaleniu sekwencji DNA możliwe jest również poznanie genów kodujących czynniki wirulencji bakterii. Proces sekwencjonowania wykorzystywany jest także w analizie wektorów do modyfikacji genetycznych organizmów.

Słownik

dideoksynukleotydy

nukleotydy niezawierające grupy hydroksylowej, a jedynie wodór w pozycjach 2' i 3' cukru, co nie pozwala na wytworzenie wiązania fosfodiesterowego z kolejnym nukleotydem; efektem przyłączenia dideoksynukleotydu jest zakończenie procesu syntezy nici DNA

chromatografia

(gr. *chrōma* – barwa, *gráphō* – piszę) metoda rozdzielania jednorodnych mieszanin na składniki, w której wykorzystuje się różnicę sił oddziaływania tych składników z fazą ruchomą i nieruchomą (stacjonarną)

elektroforeza

technika analityczna, rzadziej preparatywna, stosowana w chemii i biologii molekularnej, zwłaszcza w genetyce; jej istotą jest rozdzielenie mieszaniny związków chemicznych na możliwie jednorodne frakcje przez wymuszenie wędrówki ich cząsteczek w polu elektrycznym

genom

kompletny zestaw informacji genetycznej danego organizmu

lepkie końce DNA

jednoniciowe zakończenia „wystające” z dwuniciowych liniowych cząsteczek DNA; powstają w wyniku działania niektórych endonukleaz (np. enzymów restrykcyjnych) lub terminalnej transferazy

nukleotydy

cząsteczki zbudowane z pięciowęglowego cukru połączonego z zasadą azotową i jedną lub kilkoma resztami fosforanowymi; nukleotydy m.in. budują kwasy nukleinowe

polimeraza DNA

enzym należący do nukleotydylotransferaz, syntetyzujący z odpowiednich nukleotydów trifosforanowych cząsteczki kwasów deoksyrybonukleinowych i rybonukleinowych według wzoru zakodowanego w materiale genetycznym organizmu, a tym samym wydłużający drugą, komplementarną nić DNA w trakcie jego replikacji

starter

(ang. *primer*); krótki, jednoniciowy oligonukleotyd, komplementarny do jednej z nici DNA, dostarczający w procesie replikacji DNA wolną grupę 3'-OH, od której zależna od DNA polimeraza DNA może rozpocząć syntezę nowej nici

Wirtualne laboratorium (WL-I)

Laboratorium 1

Przeprowadź doświadczenie w pracowni genetycznej. Rozwiąż problem badawczy, zapisz wyniki, sformułuj wnioski i zweryfikuj hipotezę.

Prawidłowa sekwencja początkowego fragmentu genu łańcucha beta hemoglobiny:

GTG CAT CTG ACT CCT GAG GAG

Temat: Sekwencjonowanie genu łańcucha beta hemoglobiny metodą Sangera

Problem badawczy: Czy sekwencja genu łańcucha beta hemoglobiny w pobranej próbce DNA jest prawidłowa?

Hipoteza 1: Sekwencja genu łańcucha beta hemoglobiny w badanej próbce jest prawidłowa.

Hipoteza 2: Sekwencja genu łańcucha beta hemoglobiny w badanej próbce nie jest prawidłowa.

Sprzęt laboratoryjny:

- 4 puste probówki Eppendorfa na statywie
- pipeta automatyczna o objętości 10–100 μ l
- żel agarozowy

Odczynniki:

- próbka z matrycowym DNA
- mieszanina dideoksynukleotydów
- ddATP znakowany żółtym barwnikiem
- ddCTP znakowany niebieskim barwnikiem
- ddGTP znakowany czerwonym barwnikiem

- ddTTP znakowany zielonym barwnikiem
- polimeraza DNA



Zasób interaktywny dostępny pod adresem <https://zpe.gov.pl/a/DW7wIQZDs>

Sprawdź się

Pokaż ćwiczenia:   

Ćwiczenie 1



Ćwiczenie 2



Ćwiczenie 3



Ćwiczenie 4



Ćwiczenie 5



Ćwiczenie 6



Ćwiczenie 7



Ćwiczenie 8



Ćwiczenie 9



Dla nauczyciela

Autor: Anna Juwan

Przedmiot: Biologia

Temat: Sekwencjonowanie DNA

Grupa docelowa: uczniowie III etapu edukacyjnego – kształcenie w zakresie podstawowym i rozszerzonym

Podstawa programowa:

Zakres podstawowy

Treści nauczania – wymagania szczegółowe

VIII. Biotechnologia. Podstawy inżynierii genetycznej. Uczeń:

3) przedstawia istotę technik stosowanych w inżynierii genetycznej (elektroforeza DNA, metoda PCR, sekwencjonowanie DNA);

Zakres rozszerzony

Treści nauczania – wymagania szczegółowe

XV. Biotechnologia. Podstawy inżynierii genetycznej. Uczeń:

4) przedstawia istotę technik stosowanych w inżynierii genetycznej (hybrydyzacja DNA, analiza restrykcyjna i elektroforeza DNA, metoda PCR, sekwencjonowanie DNA);

Kształtowane kompetencje kluczowe:

- kompetencje cyfrowe;
- kompetencje osobiste, społeczne i w zakresie umiejętności uczenia się;
- kompetencje matematyczne oraz kompetencje w zakresie nauk przyrodniczych, technologii i inżynierii.

Cele operacyjne (językiem ucznia):

- Scharakteryzujesz pierwsze techniki sekwencjonowania DNA.
- Przedstawisz istotę sekwencjonowania DNA metodą Sangera.
- Wymienisz możliwości zastosowania sekwencjonowania DNA.
- Przeprowadzisz doświadczenie polegające na zsekwencjonowaniu genu łańcucha beta hemoglobiny metodą Sangera.

Strategie nauczania:

- konstruktywizm;
- konektywizm.

Metody i techniki nauczania:

- z użyciem komputera;
- rozmowa kierowana;
- ćwiczenia interaktywne;
- ćwiczenia laboratoryjne.

Formy pracy:

- praca indywidualna;
- praca w parach;
- praca w grupach;
- praca całego zespołu klasowego.

Środki dydaktyczne:

- komputery z głośnikami, słuchawkami i dostępem do internetu;
- zasoby multimedialne zawarte w e-materiale;
- tablica interaktywna/tablica, pisak/kreda.

Przed lekcją:

1. Uczniowie zapoznają się z treścią w sekcji „Przeczytaj”.

Przebieg lekcji

Faza wstępna:

1. Nauczyciel wyświetla na tablicy temat lekcji oraz cele zajęć, omawiając lub ustalając razem z uczniami kryteria sukcesu.
2. **Rozmowa wprowadzająca.** Nauczyciel prosi chętnych/wybranych uczniów o wyjaśnienie, na czym polega sekwencjonowanie DNA. W razie potrzeby naprowadza na prawidłową odpowiedź.

Faza realizacyjna:

1. **Praca w grupach.** Nauczyciel dzieli klasę na cztery grupy i każda z nich losuje kartkę z pytaniem:
 - 1) Jak przebiega metoda chemiczna sekwencjonowania DNA?
 - 2) Jak przebiega metoda enzymatyczna (Sangera) sekwencjonowania DNA?
 - 3) Jaka jest historia poznawania kolejności nukleotydów w DNA?

4) Do czego możemy wykorzystać informacje zawarte w sekwencji DNA?

Zadaniem każdej grupy jest przygotowanie odpowiedzi na wylosowane pytanie.

Nauczyciel wyznacza czas potrzebny na opracowanie zagadnienia przez uczniów.

Następnie każda grupa omawia swoją odpowiedź, a nauczyciel podsumowuje wiedzę uczniów.

- 2. Praca z multimediami („Wirtualne laboratorium (WL-I)”)**. Uczniowie przeprowadzają indywidualnie doświadczenie w wirtualnej pracowni genetycznej. Rozwiązują problem badawczy, zapisują wyniki, formułują wnioski i weryfikują hipotezę. Wybrane osoby przedstawiają odpowiedzi na forum klasy.
- 3. Utrwalenie wiedzy i umiejętności.** Uczniowie samodzielnie wykonują ćwiczenie nr 8 (w którym mają za zadanie – wykorzystując wiedzę zdobytą na lekcji, zaproponować przebieg sekwencjonowania DNA w celu identyfikacji bakterii *Escherichia coli*) z sekcji „Sprawdź się”. Następnie w 4-osobowych grupach omawiają prawidłowe rozwiązanie. Po upływie wyznaczonego czasu wskazany przez nauczyciela przedstawiciel grupy prezentuje odpowiedź wraz z jej uzasadnieniem. Klasa ustosunkowuje się do niej. Nauczyciel udziela uczniom informacji zwrotnej.

Faza podsumowująca:

1. Nauczyciel wyświetla temat lekcji i cele zawarte w sekcji „Wprowadzenie”, podsumowuje omawiany na lekcji materiał, wyjaśnia wątpliwości uczniów.

Praca domowa:

1. Wykonaj ćwiczenia od 1 do 7 z sekcji „Sprawdź się”.

Materiały pomocnicze:

- Jane B. Reece i in., „Biologia Campbella”, tłum. K. Stobrawa i in., Dom Wydawniczy REBIS, Poznań 2021.
- „Encyklopedia szkolna. Biologia”, red. Marta Stęplewska, Robert Mitoraj, Wydawnictwo Zielona Sowa, Kraków 2006.

Dodatkowe wskazówki metodyczne:

- Nauczyciel może wykorzystać medium zamieszczone w sekcji „Wirtualne laboratorium (WL-I)” do podsumowania lekcji.