DNA Sequencing

Prof. Dr. Abdul Hussein Moyet AlFaisal

Ph.D. in Cancer Cellular & Molecular Genetics

Wales University- UK.

-- Introduction

-- Methods used in DNA Sequencing

1. Maxam & Gilbert Method

2. Sanger & Coulson Method

1. Maxam & Gilbert Method

– DNA fragments - using restriction enzyme.

– Labeling the 5-end of the DNA fragments by adding P 32 isotope using Polypeptidal Kinase enzyme. (Split into 2 parts)

Part One: For G and A removing

– Treating the fragments with dimethyl sulfate to add CH3 to Guanine-G- and Adenine- A. (Split into 2 parts- 3&4)

– Boiling the part 3 fragments in water to remove the methelated G.

– Boiling the part 4 fragments in diluted acid to remove the methelated G+A.

– Boiling part 3&4 in NaOH solution to remove the sugar ring and to break down the fragments into small fragments.

–Electrophoresis ..... Later?

DNA

Restriction enzyme

End labeling- Polypeptidal Kinase enzyme.

part 1

For A and G removing

Add dimethyl sulfate to add CH3 to Guanine-G- and Adenine- A.

part 4 Boiling in diluted acid to remove the methelated G+A

Part 3 Boling in water to remove the methelated G

part 2

For T and C removing

Boiling part 3&4 in NaOH solution to remove the sugar ring and to break down the fragments into small fragments. ⇨ Electrophoresis.

Maxam & Gilbert Method

DNA Extraction

DNA fragmentation with restriction enzyme

End labeling –P32 with Polypeptidal kinase enzyme

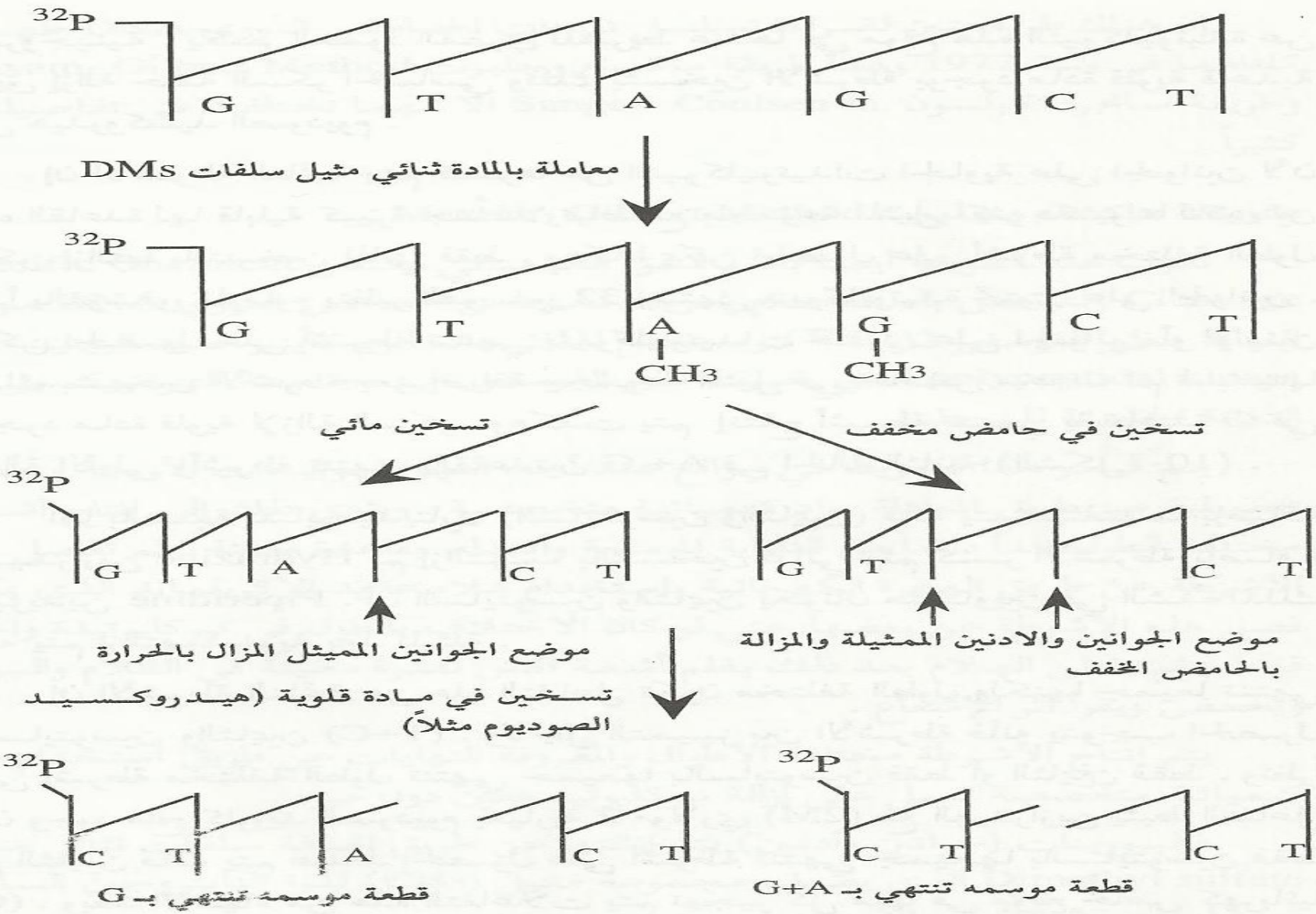
To remove A & G

Treat the fragment with Dimethyl Sulfate to add CH3 to A & G

1. Boiling in Water bath to remove G

2. Boiling in diluted acid to remove A & G

Boiling 1 & 2 products with NaoH solution to remove Sugar rings and to break the fragments either in G or in A+G end.



(الشكل 7-10): طريقة تحضير قطع موسمة من الحامض النووي معروفة النهايات في قراءة تسلسل ترددات النيوكليوتيدات وفق طريقة ماكسام وجلبرت

----G--- -----G---- - - G- - - - - G- - -

---T----- - - -T - - - - -----T----- ----T------

---A------ -----A------ - - -A - - - ----A------

- -C - - - - - C- - - - -----C----- ----C------

-----G---- ------G------ - - - G- - - - - -G - - -

---A------- -----A------ - - A- - - - ----A-----

-----A------- -------A----- - - - -A - - ----A-------

--T-------- - -T - - - - ----T------- ----T-----

- -C - - - - - - - C- - - --------C--- ---C-------

-----G----- ------G----- - - - -G - - - - G-- - -

GCTAAGCATG

DNA

Restriction enzyme

End labeling- Polypeptidal Kinase enzyme.

part 2 For T and C removing

Part 6 add Hydrazine + 2M NaCl to break down the double rings of Cytocine – C only.

Part 5 add Hydrazine to break down the double rings of Cytocine – C and Thymine –T

–Boiling the parts 5&6 fragments in boiling water bath to remove C&T.

– Treat part 5&6 with Piperidine solution to remove the sugar ring and to break down the fragments into small fragments.

– Electrophoresis

Part Two: For C and T removing

Split Part 2 into two parts - 5&6

– Treating the fragments of part 5 with Hydrazine to break down the double rings of Cytocine – C and Thymine –T .

– Treating the fragments of part 6 with Hydrazine + 2M NaCl to break down the double rings of Cytocine – C only.

– Boiling the parts 5&6 fragments in boiling water bath to remove C&T.

– Treat part 5&6 with Piperidine solution to remove the sugar ring and to break down the fragments into small fragments.

–Electrophoresis parts 3,4,5,6 together through poly acrylamide gel, X ray film, reading bands for sequencing.

Maxam & Gilbert Method

DNA Extraction

DNA fragmentation with restriction enzyme

End labeling –P32 with polypeptidal kinase enzyme

To remove C & T

Treat the fragments with Hydrazine to break down the double rings of T & C .

Treat the fragments with Hydrazine + 2M NaCl to break double ring of C only.

Boiling in water bath to remove bases.

Treating with Piperidine solution to remove Sugar rings and to break the fragments either in C or in C+T end.

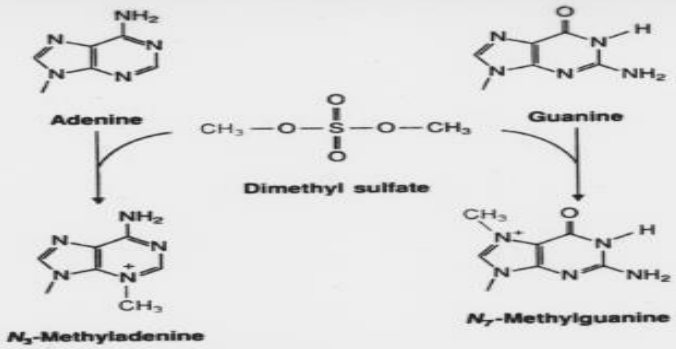


FIGURE **4A.1**
Reaction of purines with dimethyl sulfate.

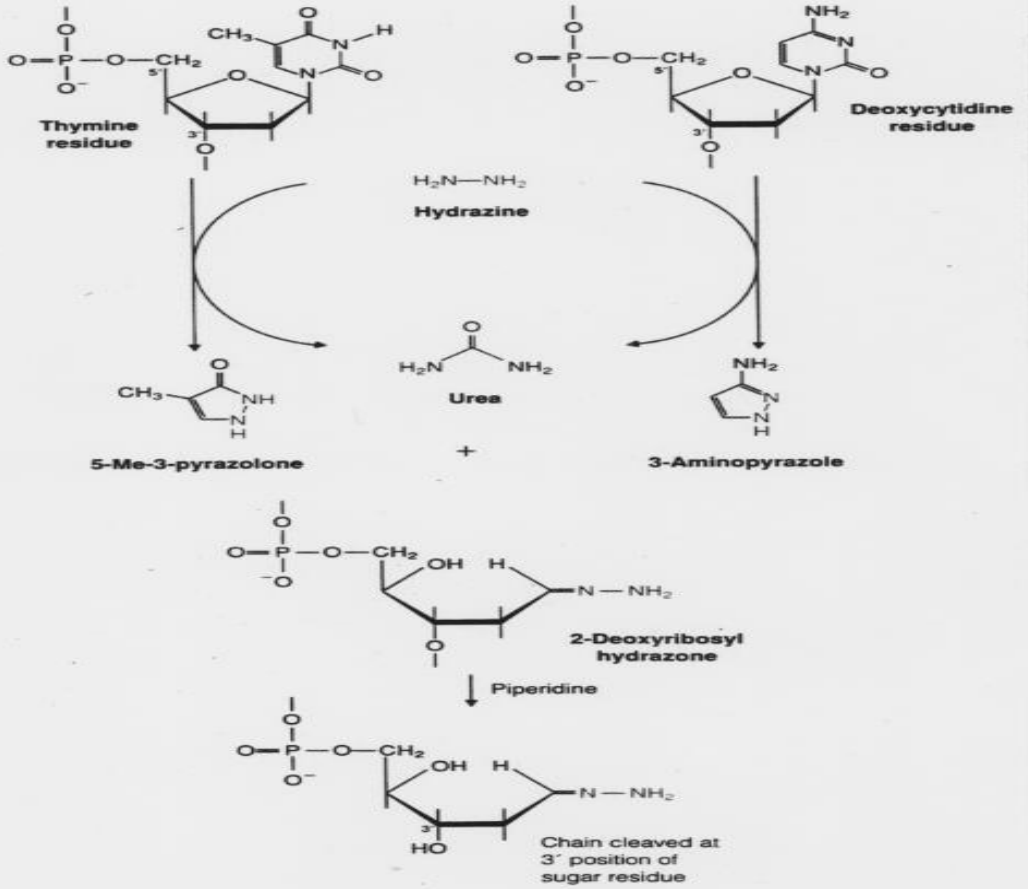
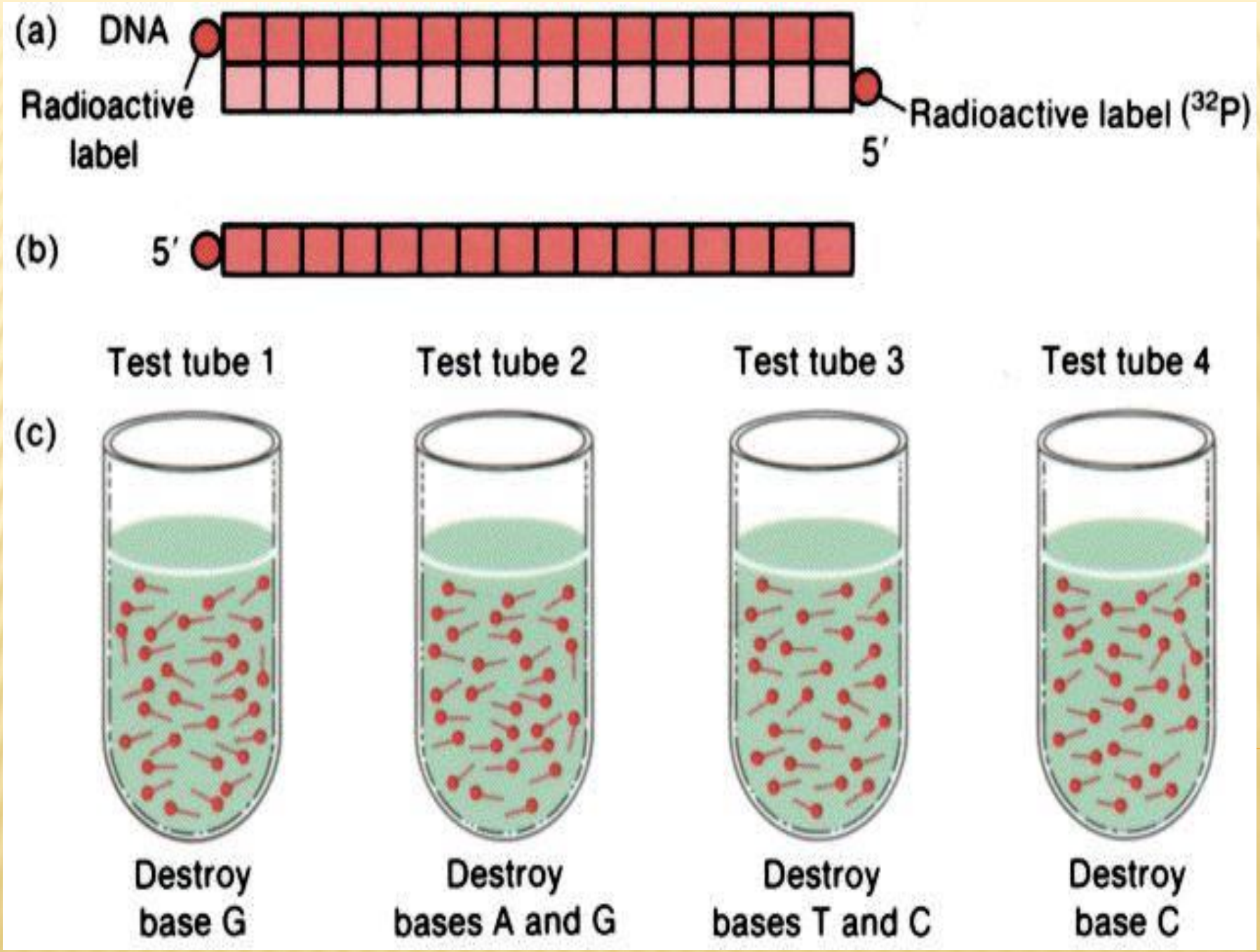
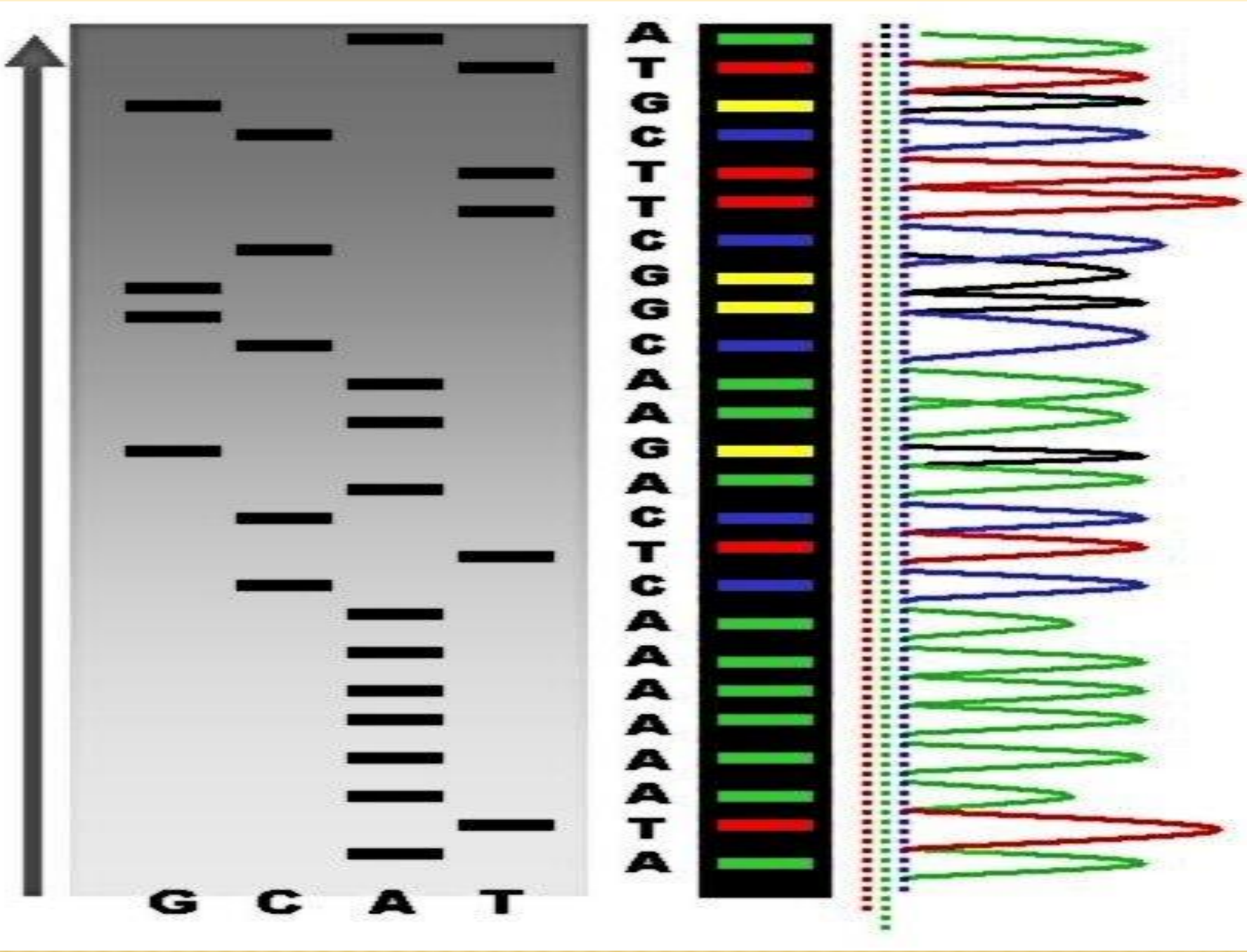


FIGURE **4A.2**
Hydrazinolysis of pyrimidines.


(a) DNA
Radioactive label
Radioactive label (^{32}P)
5′
(b)
5′
Test tube 1
Test tube 2
Test tube 3
Test tube 4
(c)
Destroy base G
Destroy bases A and G
Destroy bases T and C
Destroy base C


G C A T
A T G C T T C G G C A A G A C T C A A A A A A A T A

فلو افترضنا بأن شريط الحامض النووي الموسوم يتألف من الترددات التالية 5´TGGGCTTAGC-3´ فأنه بإجراء التفاعلات السابقة فأنه سيتم الحصول على أنواع الأشرطة التالية :

أنواع الأشرطة التي تنتهي بالقاعدة G :

^{32}P- TG
^{32}P-TGG
^{32}P-TGGG
^{32}P-TGGGCTTAG

أنواع الأشرطة التي تنتهي بالقاعدة C :

^{32}P-TGGGC
^{32}P-TGGGCTTAGC

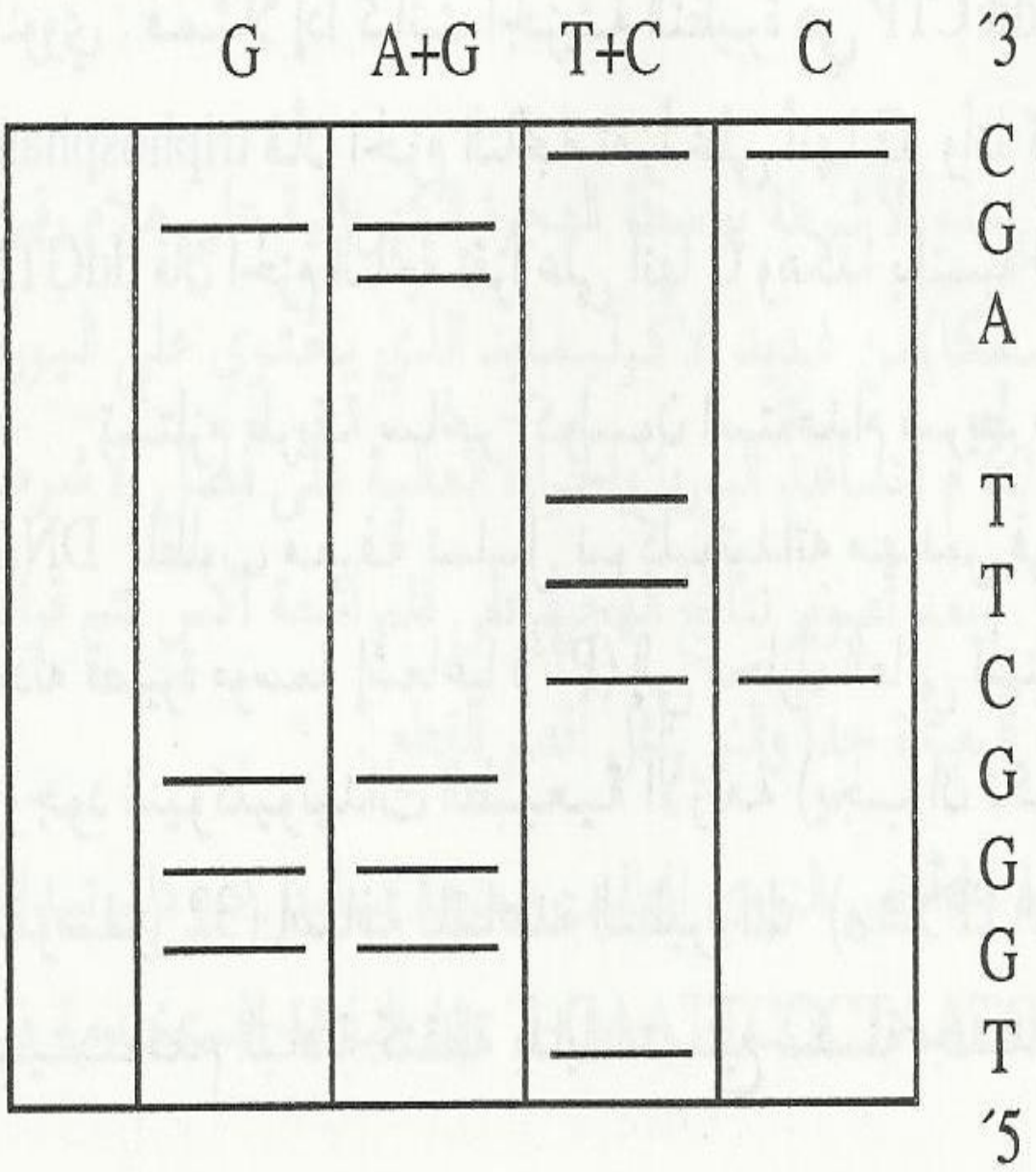
أنواع الأشرطة التي تنتهي بالقاعدتين G أو A :

^{32}P-TG
^{32}P-TGG
^{32}P-TGGG
^{32}P-TGGGCTT
^{32}P -TGGGCTTAG

الاشرطة التي تنتهي بالقاعدتين C أو T :

^{32}P-T
^{32}P-TGGGC
^{32}P-TGGGCT
^{32}P-TGGGCTT
^{32}P-TGGGCTTAGC

وعند إجراء الهجرة الكهربائية لها والحصول بعد ذلك على فلم أشعة أكس فأن النتائج ستكون كما هو في الشكل (7-11) .



(الشكل 7-11):

قراءة تسلسل التردد

TGGGCTTAG

´5 C-´3 حسب

طريقة ماكسام

وجلبرت

2. Sanger & Coulson Method

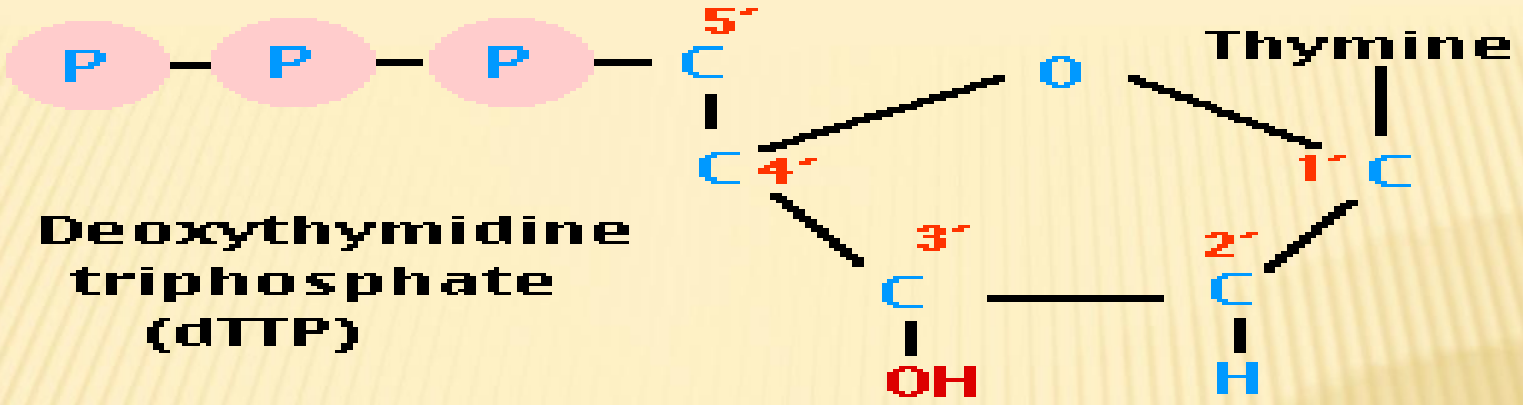
– The method used essentially nucleotide analogues called

2.3.dideoxy nucleoside triphosphate.

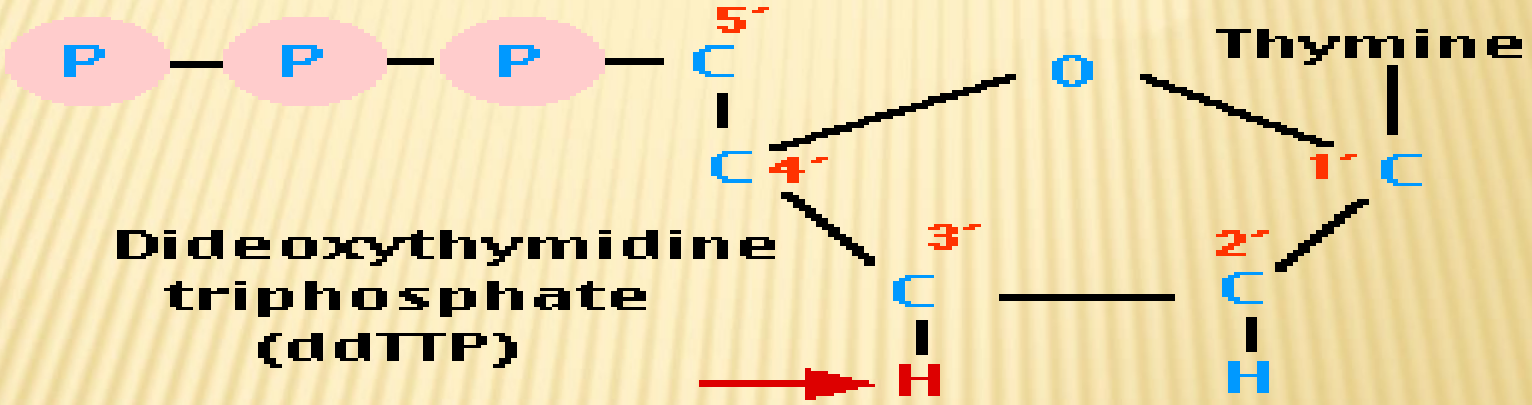
– There are four analogues base called , ddCTP, ddGTP, ddTTP and ddATP.

– These analogues bases loss the hydroxyl end. So they block the DNA synthesis soon they enter in the process.

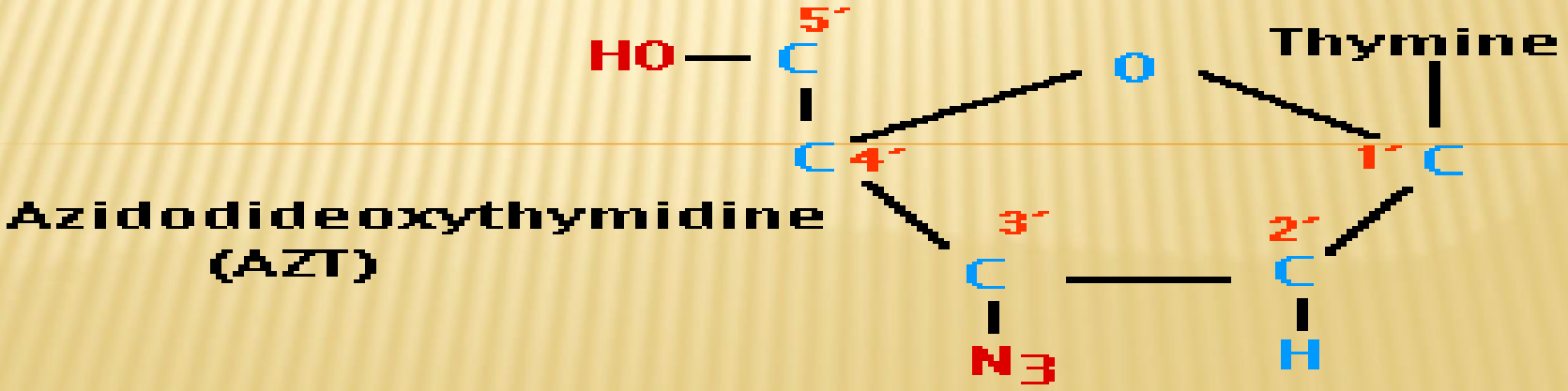
– This method need a DNA library using M13 as a vector and a p32 labeled primer.



Deoxythymidine triphosphate (dTTP)

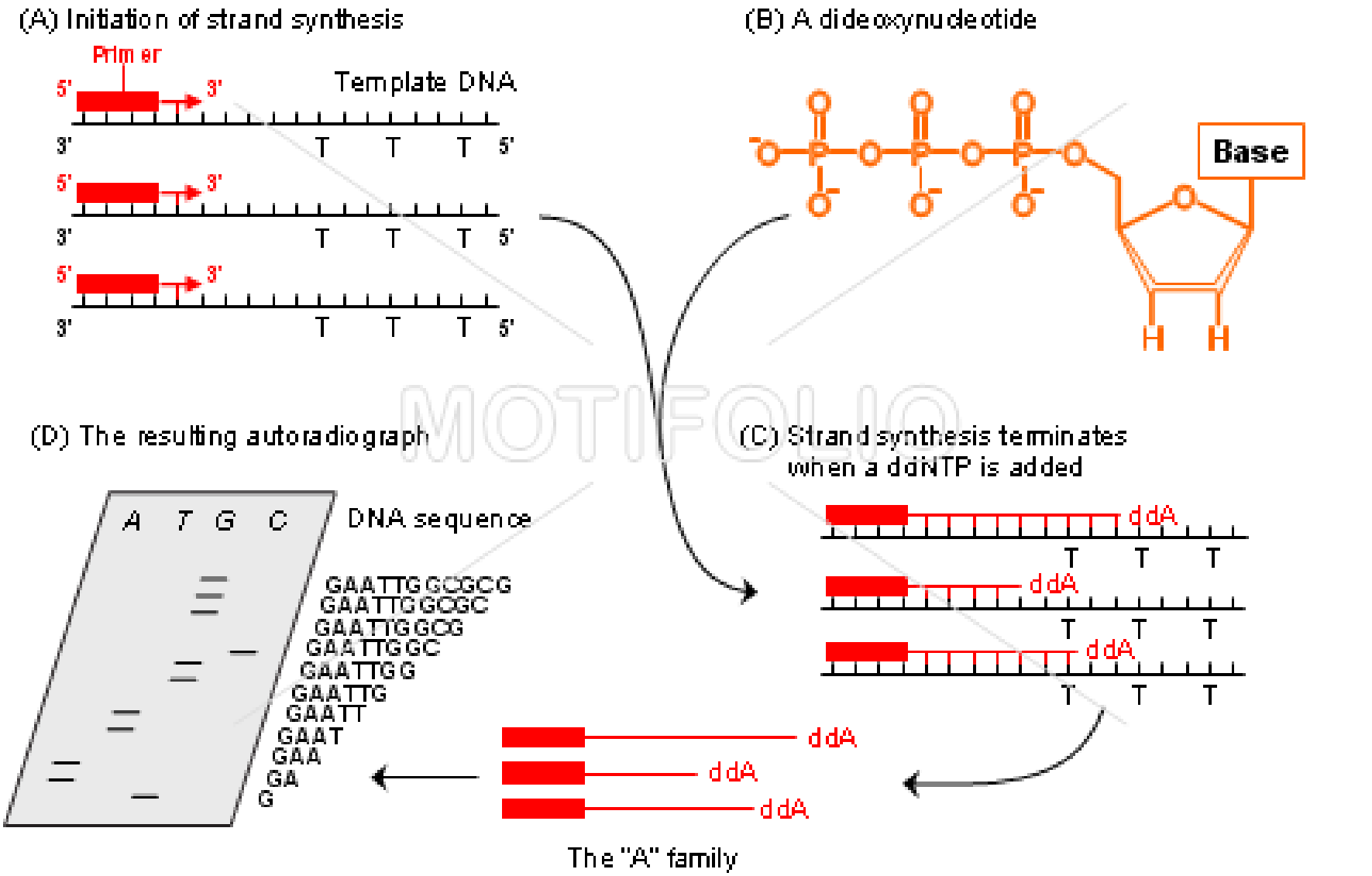


Dideoxythymidine triphosphate (ddTTP)



Azidodideoxythymidine (AZT)

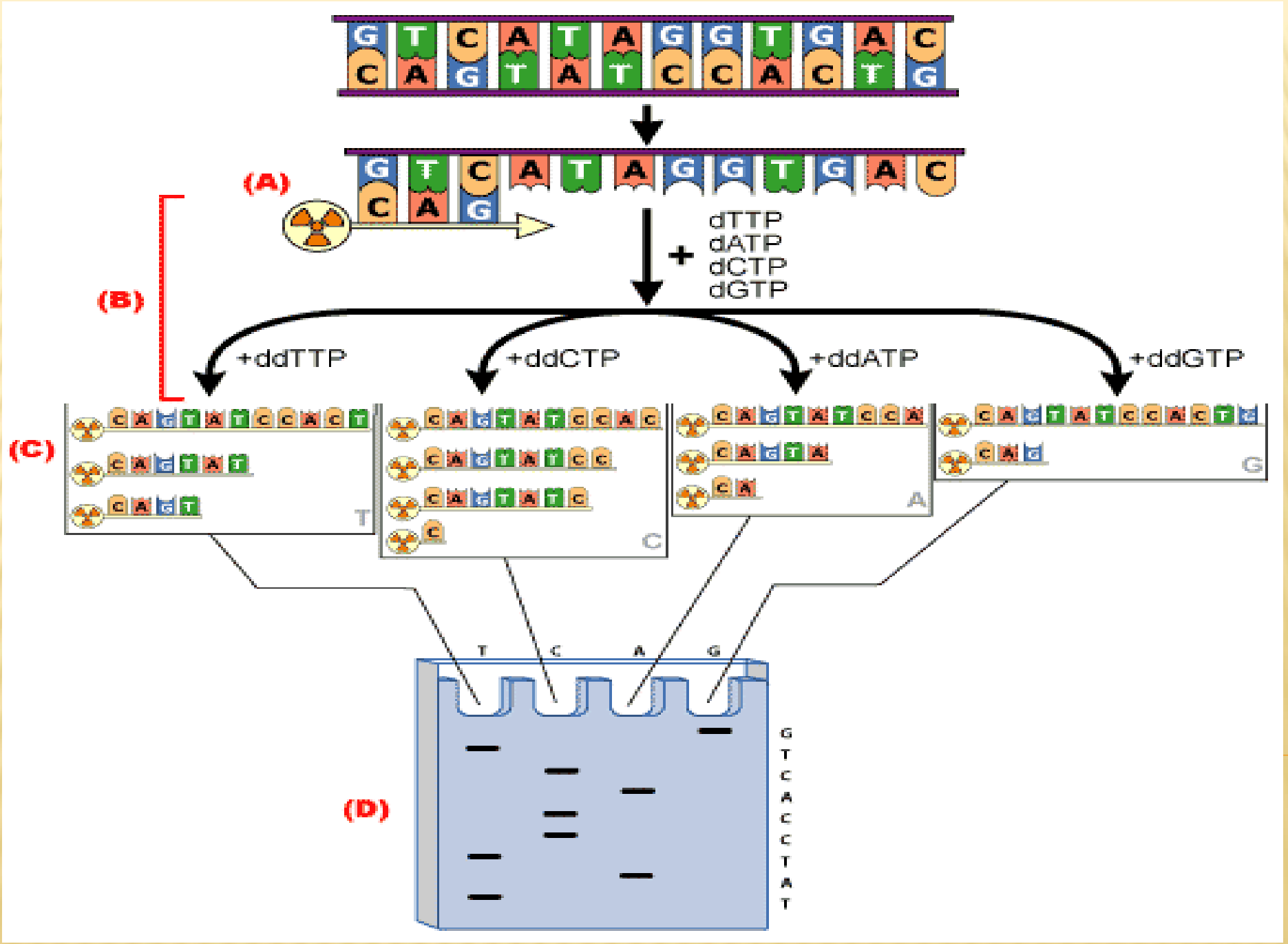
Chain termination DNA sequencing



MOTIFOLIO

6111132

Copyright © motifolio.com


(A)
(B)
(C)
(D)
dTTP
dATP
dCTP
dGTP
+
+ddTTP
+ddCTP
+ddATP
+ddGTP
T
C
A
G
T C A G
G T C A C C T A T

2. Sanger & Coulson Method

DNA Extraction

↓

Fragmentation of DNA with restriction enzyme

↓

Buliding DNA library with M13

↓

DNA Synthesis using

p32 labeled primers
2.3. N-dideoxy nucleoside triphosphate
Four Reactions

↓

Electrophoresis

فلو افترضنا أن شريط الحامض النووي المطلوب معرفة تسلسل نيوكليوتيداته مؤلف من التسلسل 5´-GAATTCGCTAATGC-3´ وإن البادئة المستخدمة في

التفاعل مؤلفة من التسلسل 3´-5CTTAA´ فأنه بإجراء التفاعلات السابقه فأنه سيتم الحصول على أنواع الأشرطة التالية :

-أنواع الأشرطة في حالة استخدام الجزيئة النظيرة ddATP :

´5 - CTTAAGCGAdd

´5 - CTTAAGCGATTAdd

-أنواع الأشرطة في حالة استخدام الجزيئة النظيره ddGTP :

´5 - CTTAAGdd
´5 - CTTAAGCGdd
´5 - CTTAAGCGATTACGdd

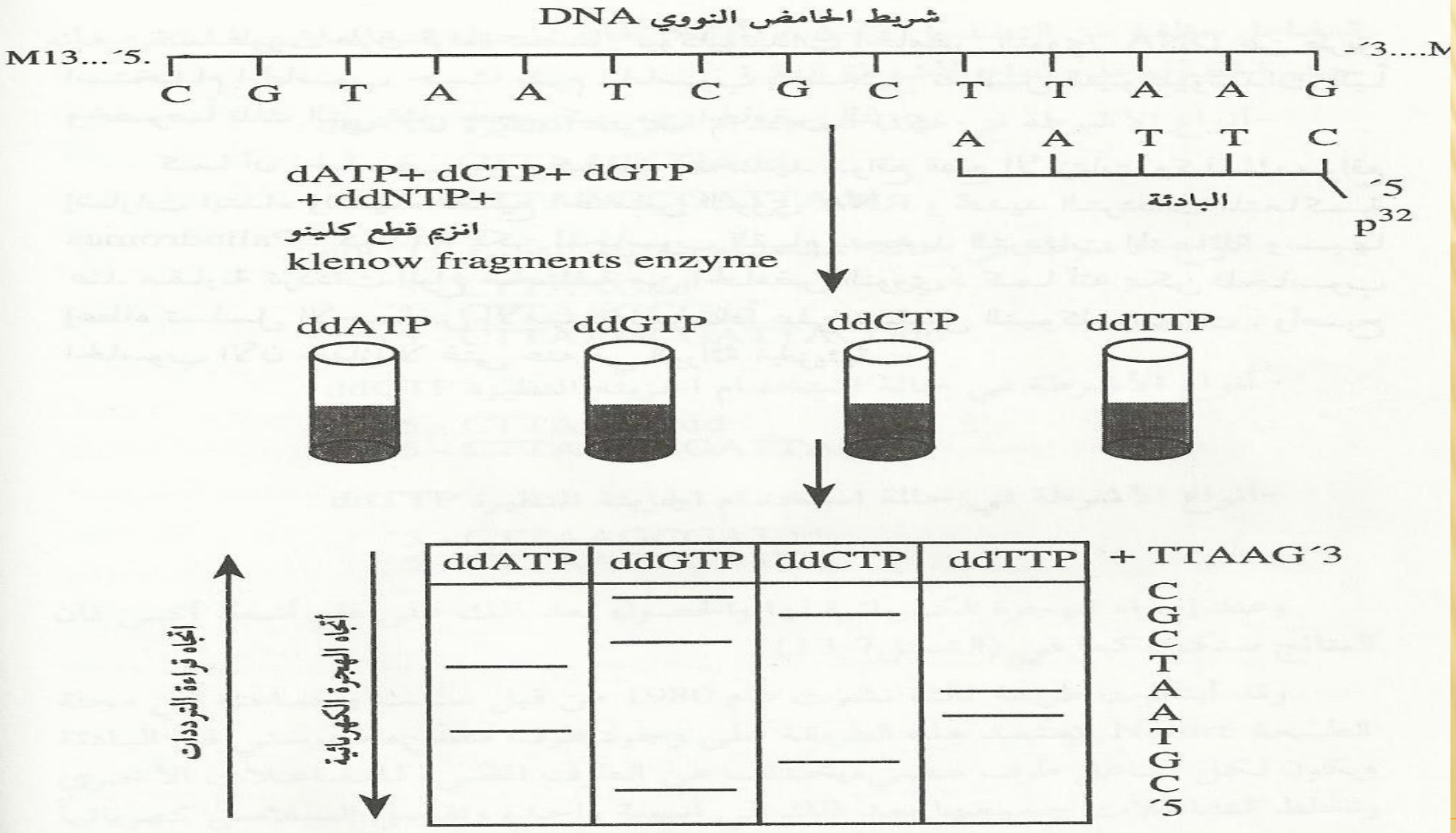
-أنواع الأشرطة في حالة استخدام الجزيئة النظيرة ddCTP :

´5 - CTTAAGCdd
´5 - CTTAAGCGATTACdd

-أنواع الأشرطة في حالة استخدام الجزيئة النظيرة ddTTP :

´5 - CTTAAGCGATdd
´5 - CTTAAGCGATTdd

وعند إجراء الهجرة الكهربائية لها والحصول بعد ذلك على فلم أشعة أكس فأن النتائج ستكون كما في (الشكل7-13) .



(شكل 7-13): طريقة سانجر-كولسون في قراءة تسلسل ترددات نيوكليوتيدات الحامض النووي DNA. ان دخول جزيئة dd في التفاعل تؤدي إلى إيقاف نمو سلسلة الحامض النووي عند موقع الدخول وعند استخدام أربعة أنواع من جزيئات dd فانه يمكن الحصول على أربعة أنواع من جزيئات الحامض الموسمة النهاية

Thank you so much