

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?

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



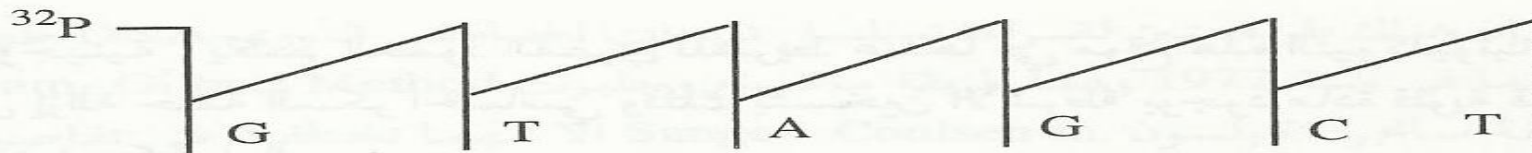
1. Boiling in **Water bath** to remove G



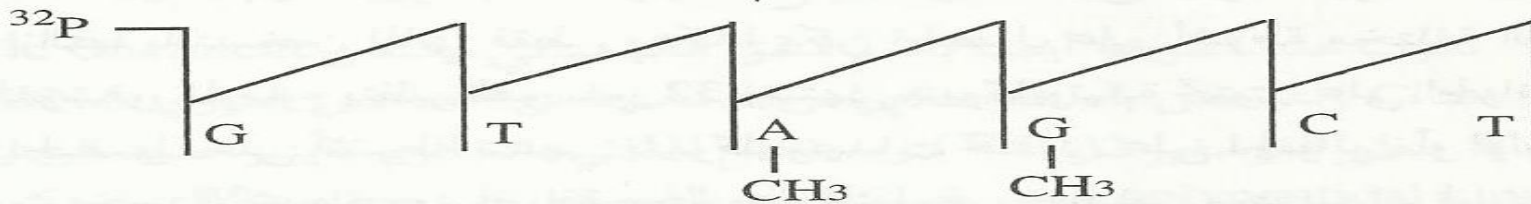
2. Boiling in **diluted acid** to remove A & G



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



معاملة بالمادة ثنائي مثيل سلفات DMS



تسخين مائي

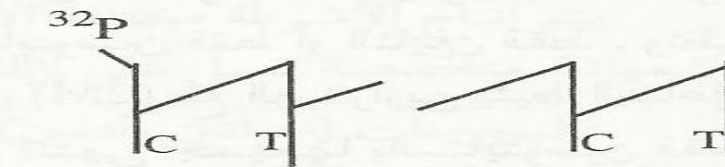
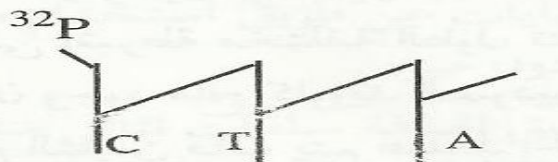
تسخين في حامض مخفف



موضع الجوانين الميثيل المزال بالحرارة

موضع الجوانين والادنين الميثيلة والمزالة بالحامض المخفف

تسخين في مادة قلوية (هيدروكسيد الصوديوم مثلاً)



قطعة موسمه تنتهي بـ G

قطعة موسمه تنتهي بـ G+A

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

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.

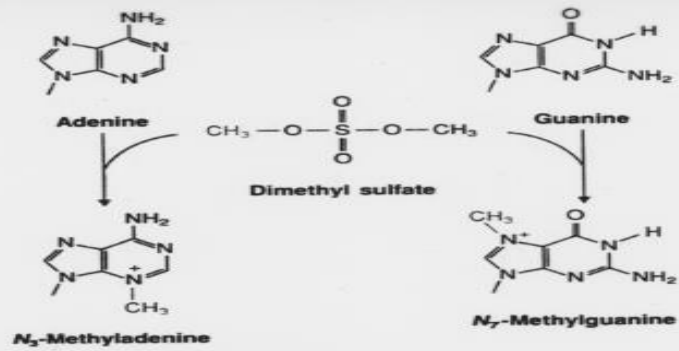


FIGURE 4A.1
Reaction of purines with dimethyl sulfate.

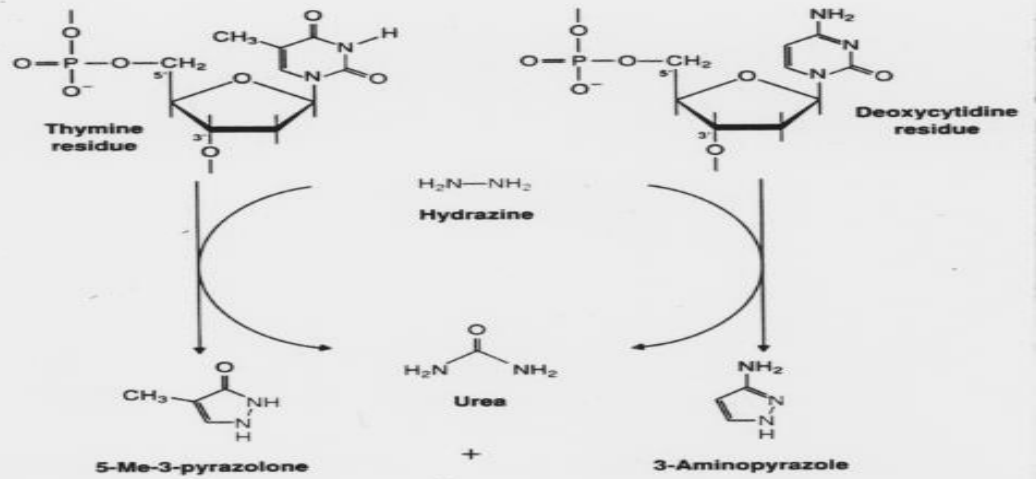
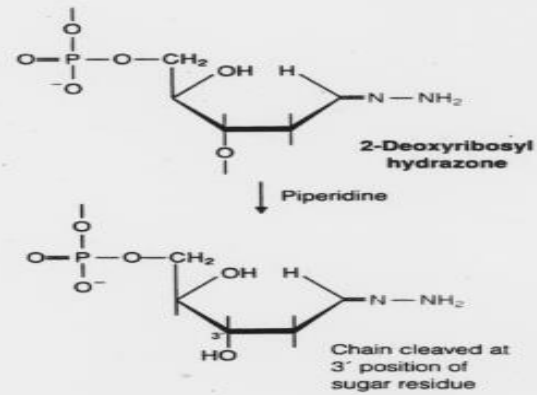
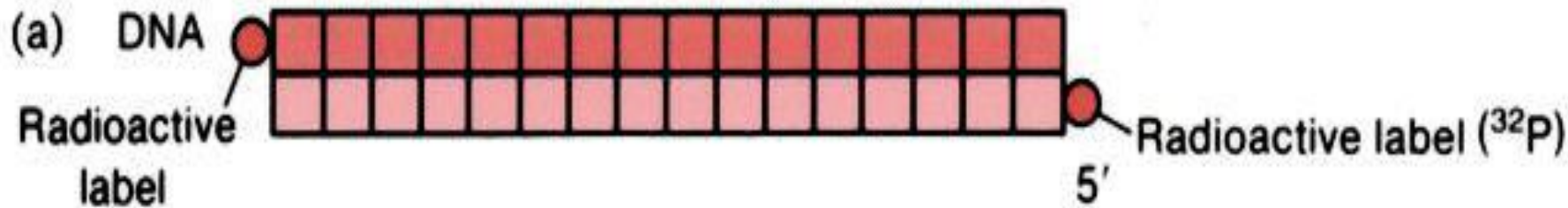


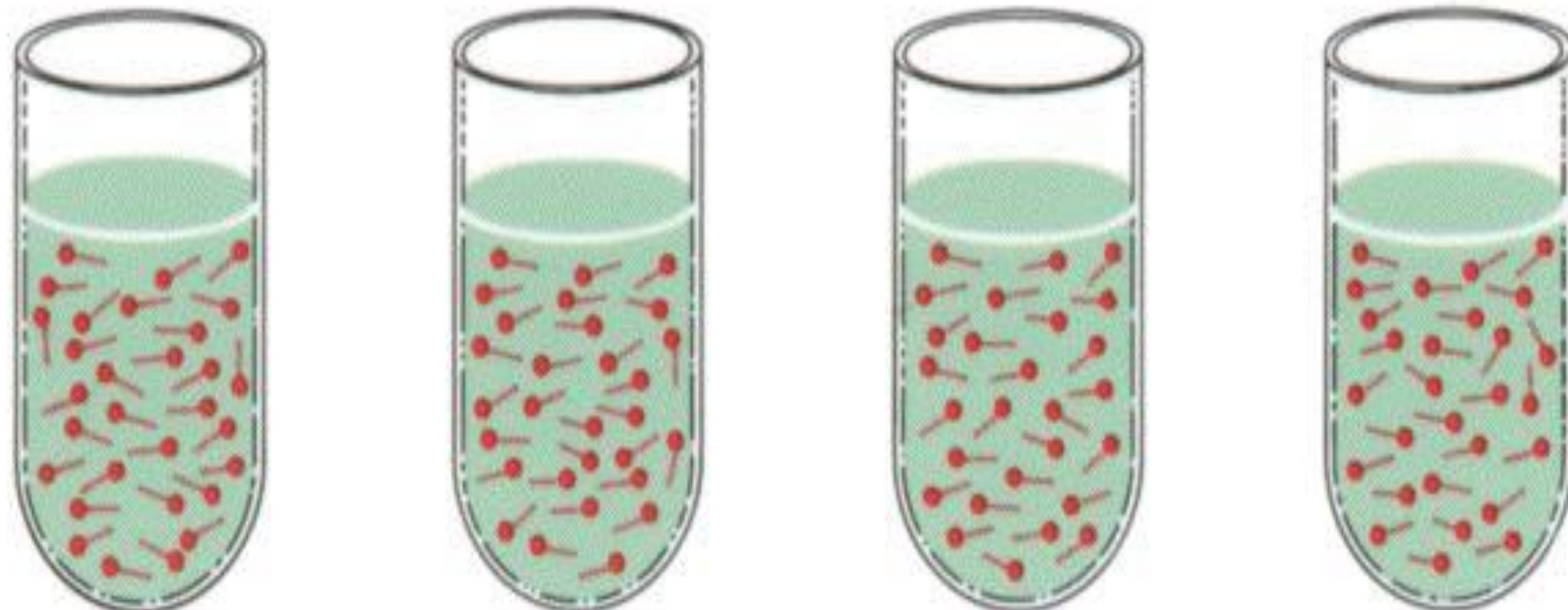
FIGURE 4A.2
Hydrazinolysis of pyrimidines.





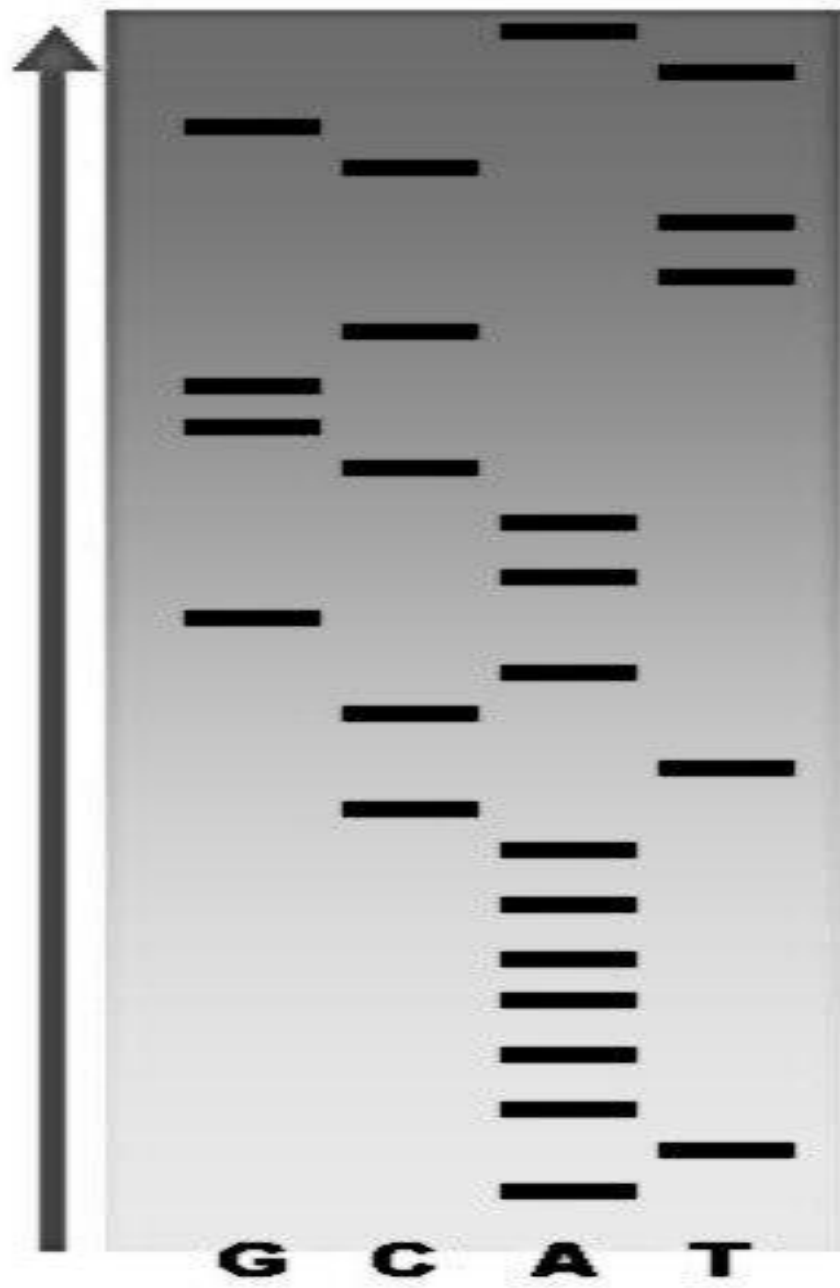
(c)

Test tube 1 Test tube 2 Test tube 3 Test tube 4

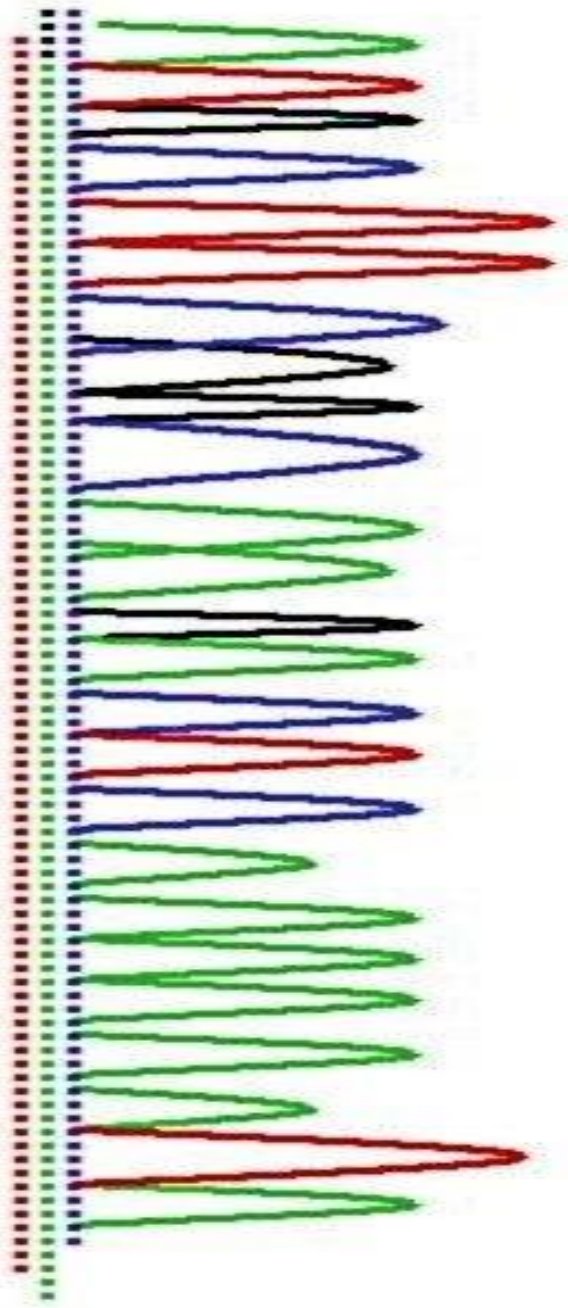


Destroy base G Destroy bases A and G Destroy bases T and C Destroy base C

Detailed description: Four test tubes are shown, each containing a green liquid and several red DNA fragments. The fragments are shorter than the original DNA shown in (a) and (b). Below each test tube is a label indicating the type of base deletion: 'Destroy base G', 'Destroy bases A and G', 'Destroy bases T and C', and 'Destroy base C'.



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



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

أنواع الأشرطة التي تنتهي بالقاعدة C :

$^{32}\text{P-TGGGC}$

$^{32}\text{P-TGGGCTTAGC}$

أنواع الأشرطة التي تنتهي بالقاعدة G :

$^{32}\text{P-TG}$

$^{32}\text{P-TGG}$

$^{32}\text{P-TGGG}$

$^{32}\text{P-TGGGCTTAG}$

الاشرطة التي تنتهي بالقاعدتين C أو T :

$^{32}\text{P-T}$

$^{32}\text{P-TGGGC}$

$^{32}\text{P-TGGGCT}$

$^{32}\text{P-TGGGCTT}$

$^{32}\text{P-TGGGCTTAGC}$

أنواع الأشرطة التي تنتهي بالقاعدتين G أو A :

$^{32}\text{P-TG}$

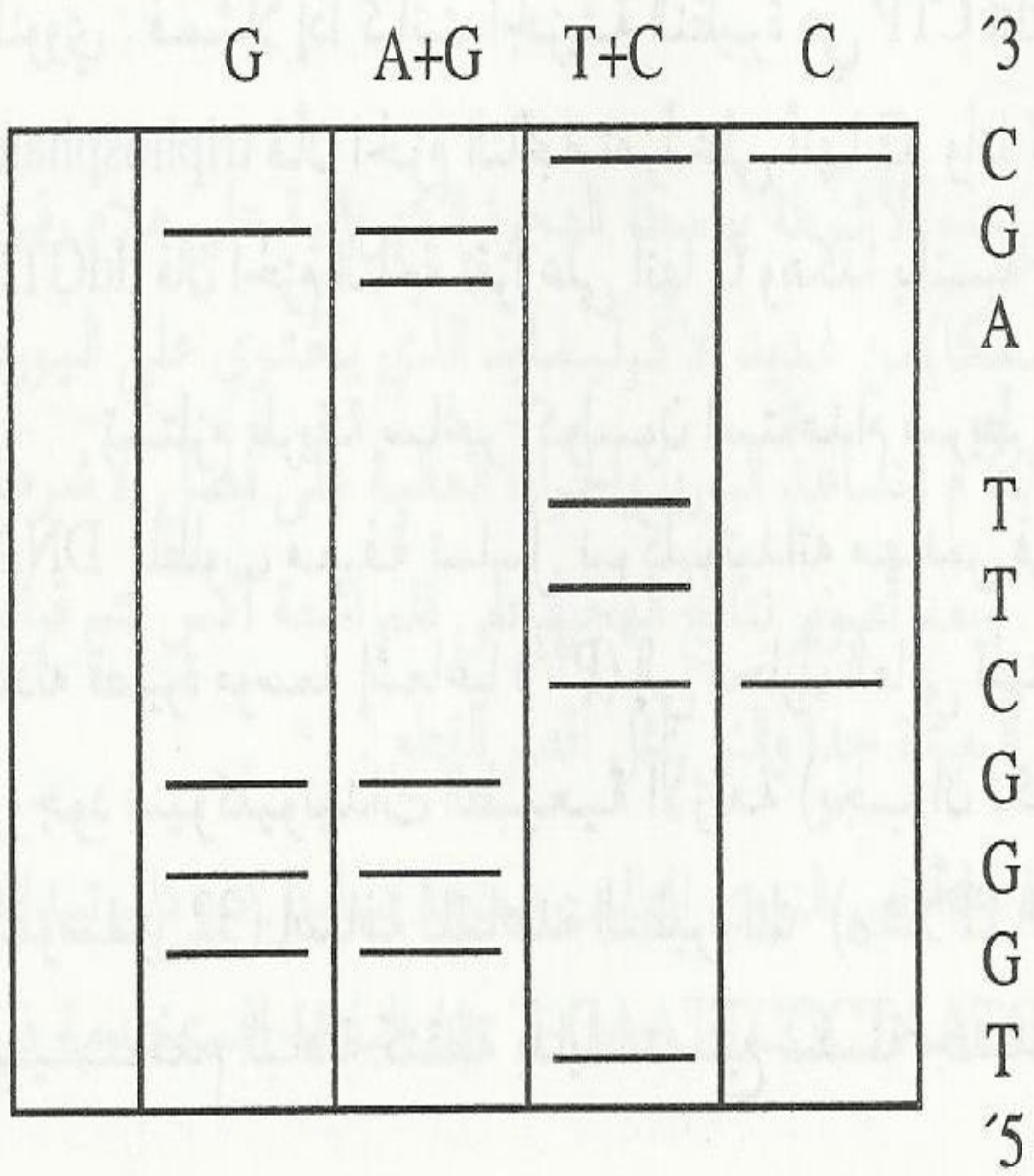
$^{32}\text{P-TGG}$

$^{32}\text{P-TGGG}$

$^{32}\text{P-TGGGCTT}$

$^{32}\text{P-TGGGCTTAG}$

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



(الشكل 7-11):

قراءة تسلسل التردد

TGGGCTTAG

3'-C'5' ← حسب

طريقة ماكسام

وجلبرت

2. Sanger & Coulson Method

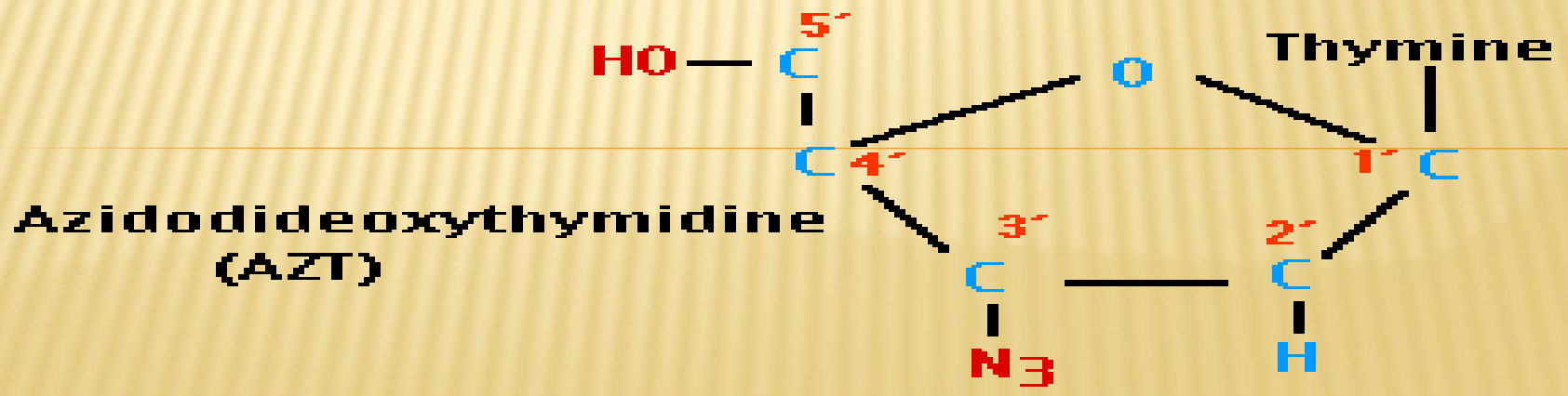
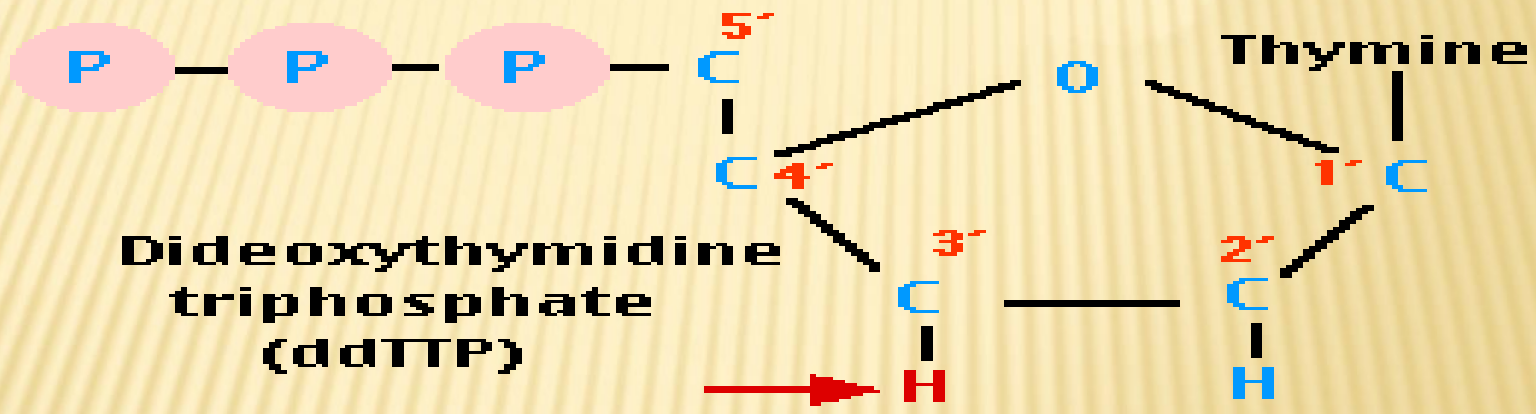
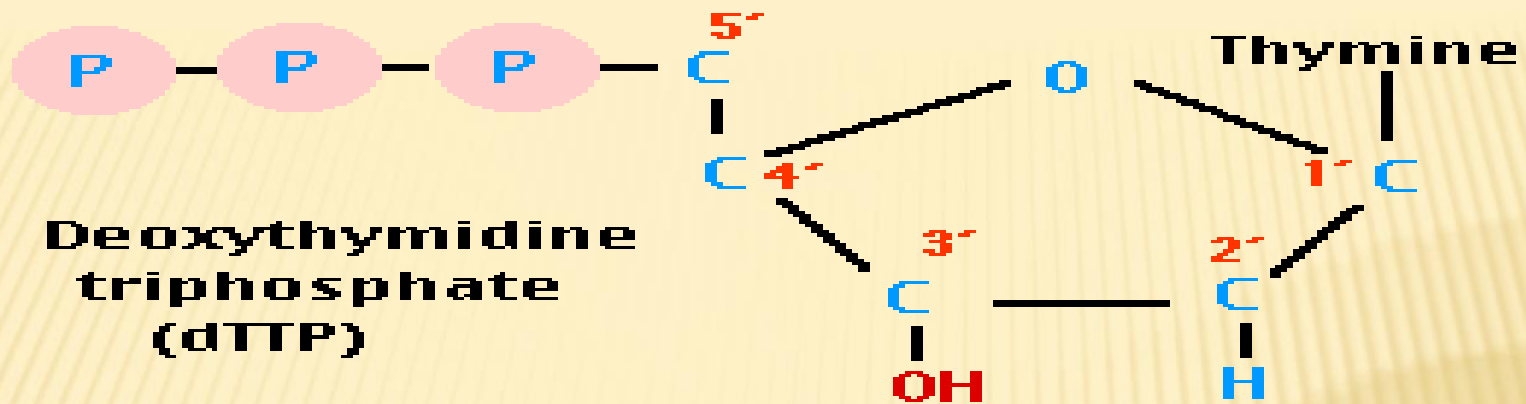
– The method used essentially nucleotide analogues called

2.3. dideoxy nucleoside triphosphate.

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

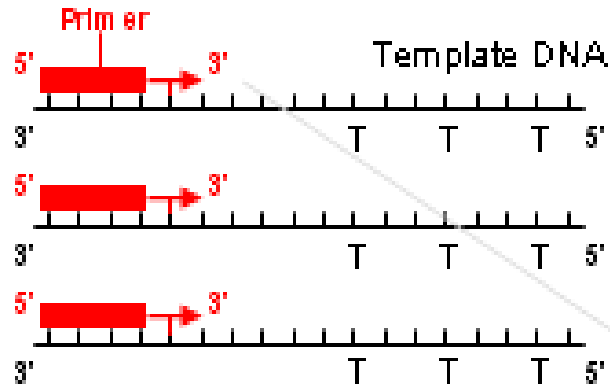
– These analogues bases loss the hydroxyl end. So they block the DNA synthesis soon they enter in the process.

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

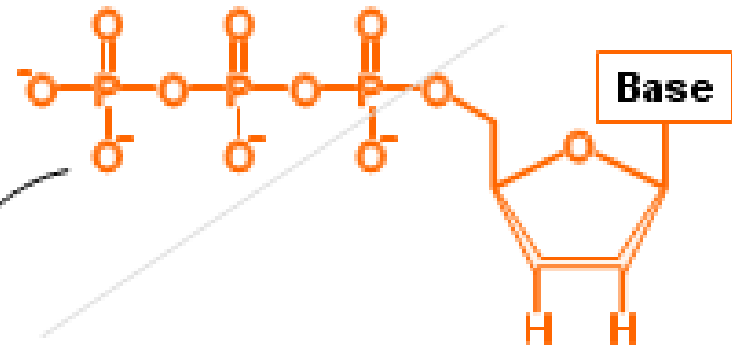


Chain termination DNA sequencing

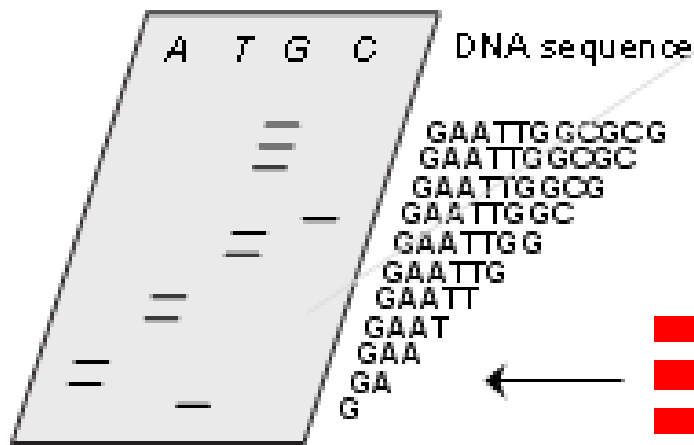
(A) Initiation of strand synthesis



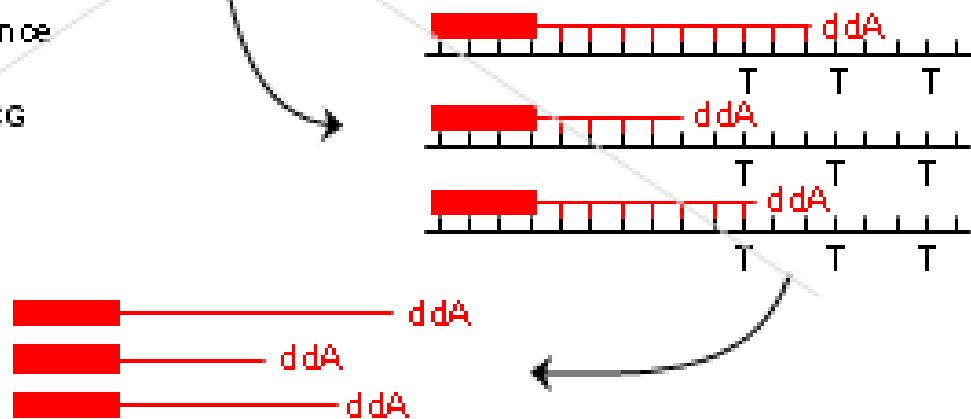
(B) A dideoxynucleotide



(D) The resulting autoradiograph



(C) Strand synthesis terminates when a ddNTP is added



The "A" family



(A)



+ dTTP
 + dATP
 + dCTP
 + dGTP

(B)

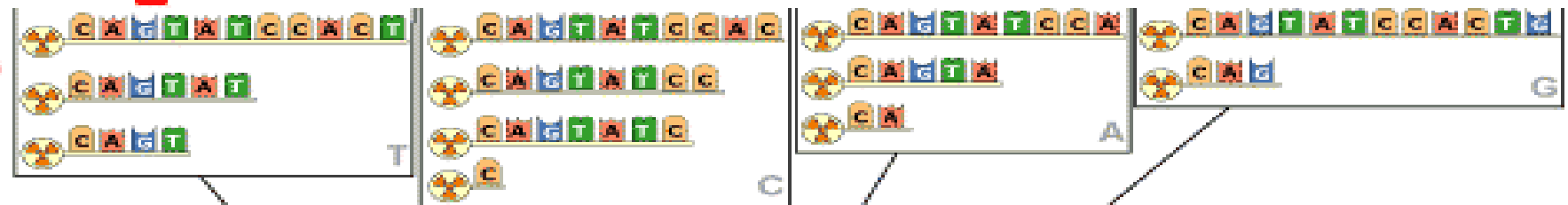
+ddTTP

+ddCTP

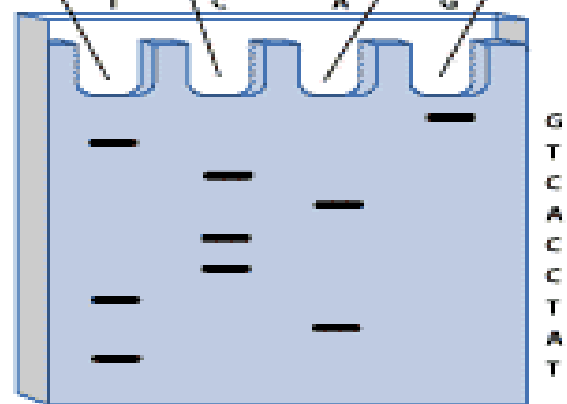
+ddATP

+ddGTP

(C)



(D)



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'-CTTAA-5' فإنه بإجراء التفاعلات السابقه فإنه 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

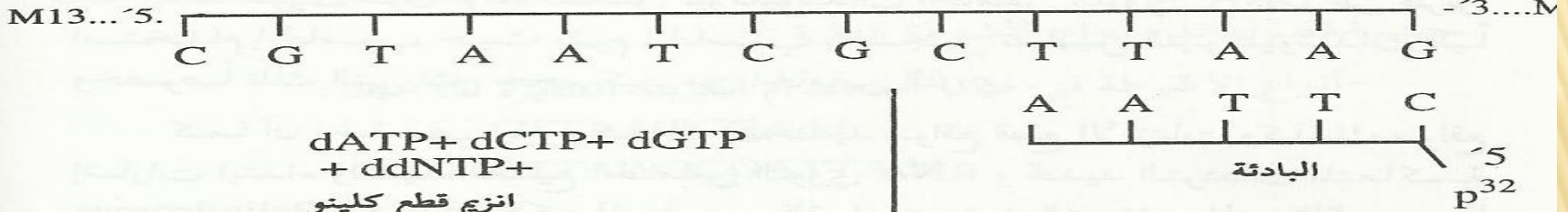
-أنواع الأشرطة في حالة استخدام الجزيئة النظيرة ddTTP :

5 - CTTAAGCGATdd

5 - CTTAAGCGATTdd

وعند إجراء الهجرة الكهربائية لها والحصول بعد ذلك على فلم أشعة أكس فإن النتائج ستكون كما في (الشكل 7-13) .

شريط الحامض النووي DNA



dATP+ dCTP+ dGTP
+ ddNTP+
انزيم قطع كلينو
klenow fragments enzyme

ddATP



ddGTP



ddCTP



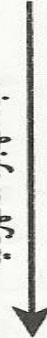
ddTTP



اتجاه قراءة الترددات



اتجاه الهجرة الكهربائية



ddATP	ddGTP	ddCTP	ddTTP
	—		
—	—	—	
—			—
	—	—	

+ TTAAG³

C
G
C
T
A
A
T
G
C⁵

(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 فإنه يمكن الحصول على أربعة أنواع من جزيئات الحامض الموسمة النهاية

Thank you so much

