

# GIẢI TRÌNH TỰ DNA (DNA SEQUENCING)

NGUYEN LE THANH (MRES)

SUB-DEPARTMENT MEDICAL BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY

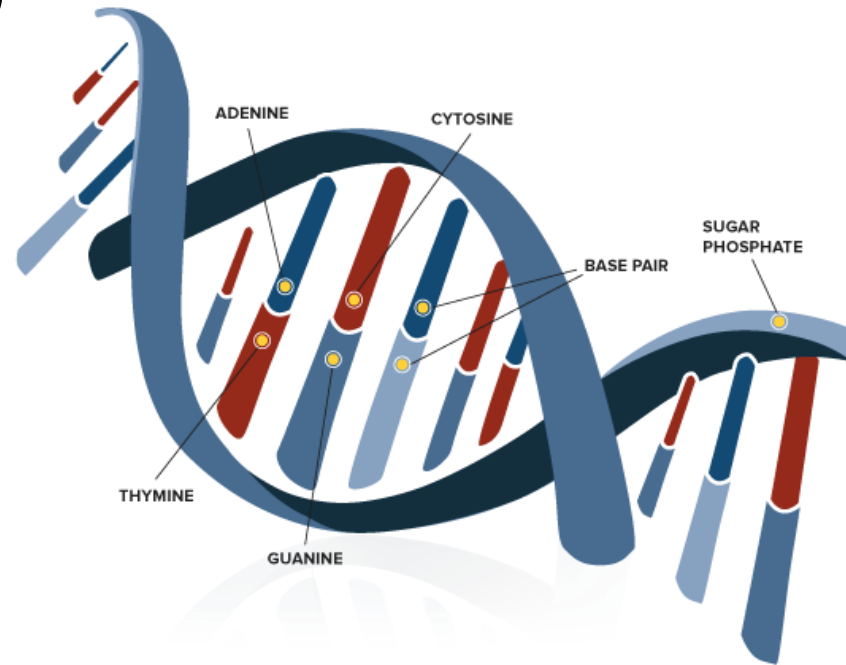
PHAM NGOC THACH MEDICAL UNIVERSITY

# Giải trình tự DNA

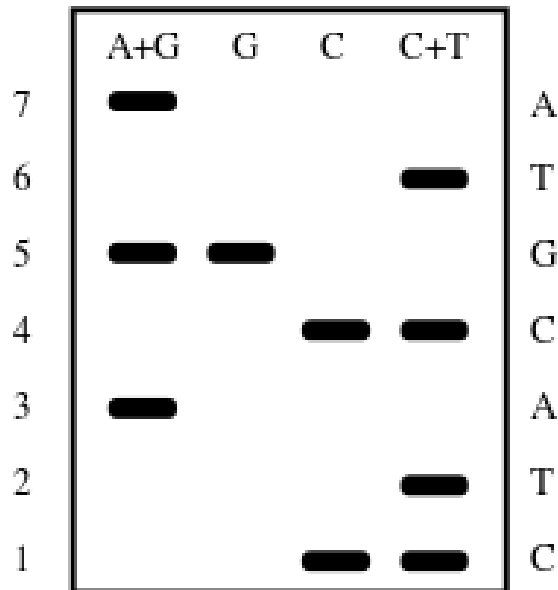
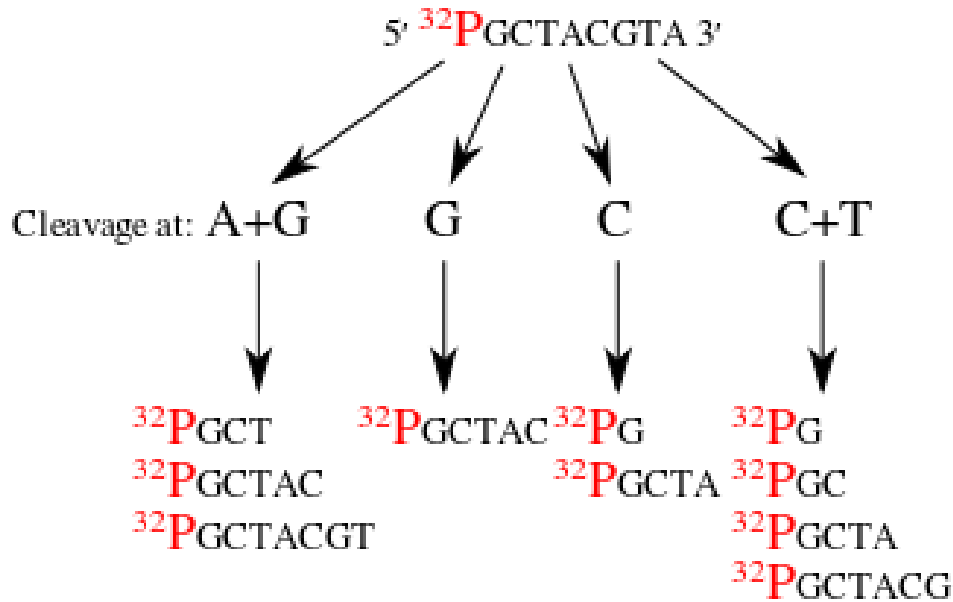
- Xác định chính xác trình tự chuỗi DNA của một vùng quy định trên nhiễm sắc thể
- Xác định bản chất gene
  - Điều hòa
  - Cấu trúc
  - Bổ sung gì?

# Giới thiệu sơ lược

- Giải trình tự DNA:
  - Xác định thứ tự của nucleotide (ATGC) trên DNA khuôn
- Trình tự Sanger:
  - DNA khuôn khuếch đại
  - Huỳnh quang “dừng chuỗi” (ddNTP) đánh dấu điểm dừng
- Giải trình tự thế hệ mới/tiếp theo – Next Generation Sequencing (NGS)
  - Hiện đại
  - Quy mô lớn
  - Tốc độ cao
  - Giá thành giảm



# Phương pháp



Sequencing Gel

## (1) Phương pháp hóa học của Maxam-Gilbert

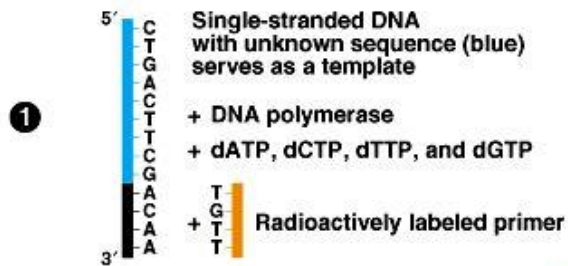
- Đồng vị phóng xạ P32 ở đầu 5' của mạch đơn
- Xử lí hóa học đặc hiệu → **phân hủy đặc trưng** một loại nucleotide của mạch DNA → **tạo các đoạn oligonucleotide có chiều dài hơn kém nhau 1 nucleotide** được phát hiện bằng điện di
- Điện di trên gel polyacriamid → trình tự mạch đơn.
- (G, A+G, C, C+T)
- Hóa chất độc hại, phóng xạ

# Phương pháp

## (2) Phương pháp enzyme sử dụng các dideoxynucleotide (Trình tự Sanger):

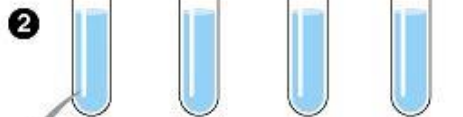
- Nguyên liệu
  - Mạch bổ sung
  - DNA polymerase
  - DNA primer
  - dNTP
  - **ddNTP (di-deoxyribosenucleotide triphosphate) không có -OH → kết thúc quá trình kéo dài chuỗi**
- Quy trình
  - Sao chép DNA (Clone DNA)
  - Gắn primer
  - Cho hỗn hợp DNA+primer+dNTP vào từng ống có chứa ddNTP riêng biệt → 4 ống
  - Điện di đọc kết quả

# SANGER METHOD



Prepare four reaction mixtures

+ ddATP + ddCTP + ddTTP + ddGTP

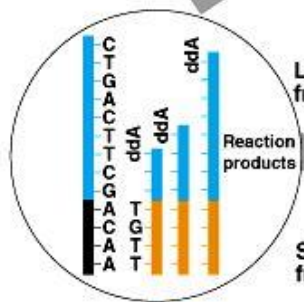


New strands separated by electrophoresis

DNA synthesis

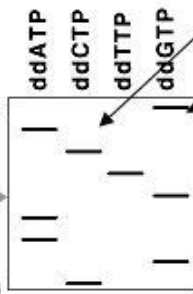
Gel electrophoresis followed by autoradiography

**3**



Longer fragments

Shorter fragments



Read sequence of new strand

G  
A  
C  
T  
G  
A  
A  
G  
C

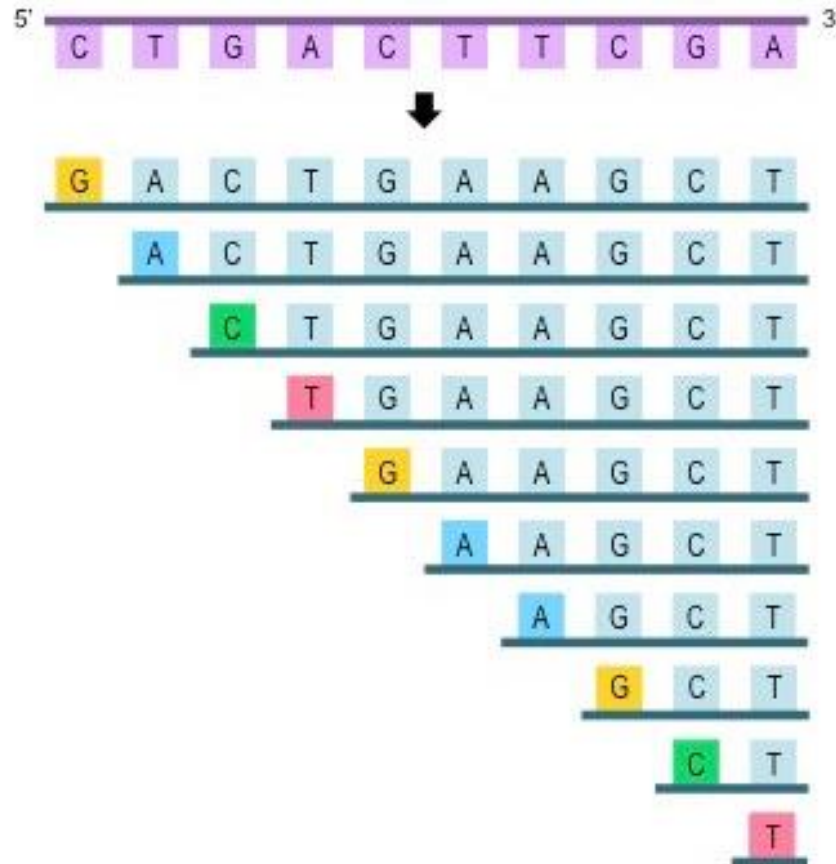
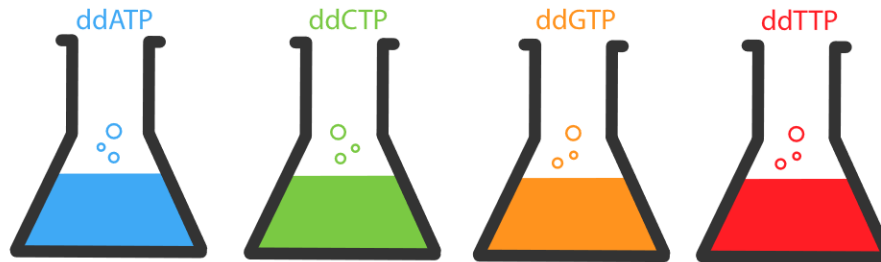
and deduce sequence of template

C  
T  
G  
A  
C  
T  
T  
C  
G

**4**

Sequence can be read from bands on autoradiograph and original template sequence deduced. Longest fragment ends with a ddG, so G must be the last base in the sequence

dATP + dCTP + dGTP + dTTP  
DNA Polymerase  
Template DNA  
Primer



# Phương pháp

## (2) Trình tự Sanger

- Ưu:
  - Không độc hại bằng M&G
  - Có thể tự động hóa
  - Đọc được chừng 700 bp?
  - Dễ sử dụng
- Nhược
  - 15-40 bp đầu dễ bị sai?
  - Mất thời gian
  - Phí đầu tư
  - Đọc được ít bp (300-1000bp)



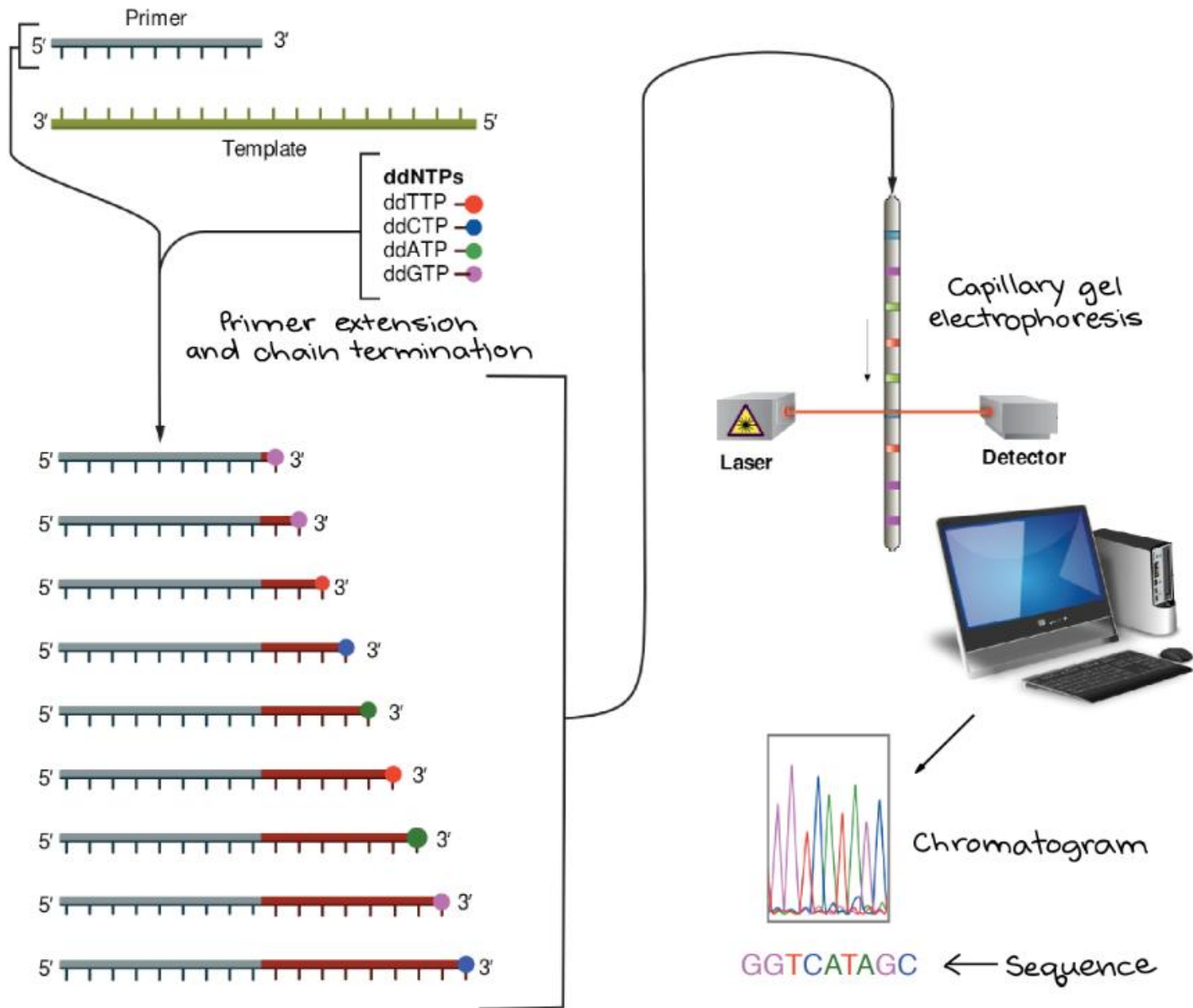


Image modified from "Sanger sequencing," by Estevezj (CC BY-SA 3.0). The modified image is licensed under a (CC BY-SA 3.0) license.

# Một số video tham khảo

- <https://www.youtube.com/watch?v=vK-HIMaitnE>
- <https://www.youtube.com/watch?v=c2bAtGycqx4>

# Phương pháp

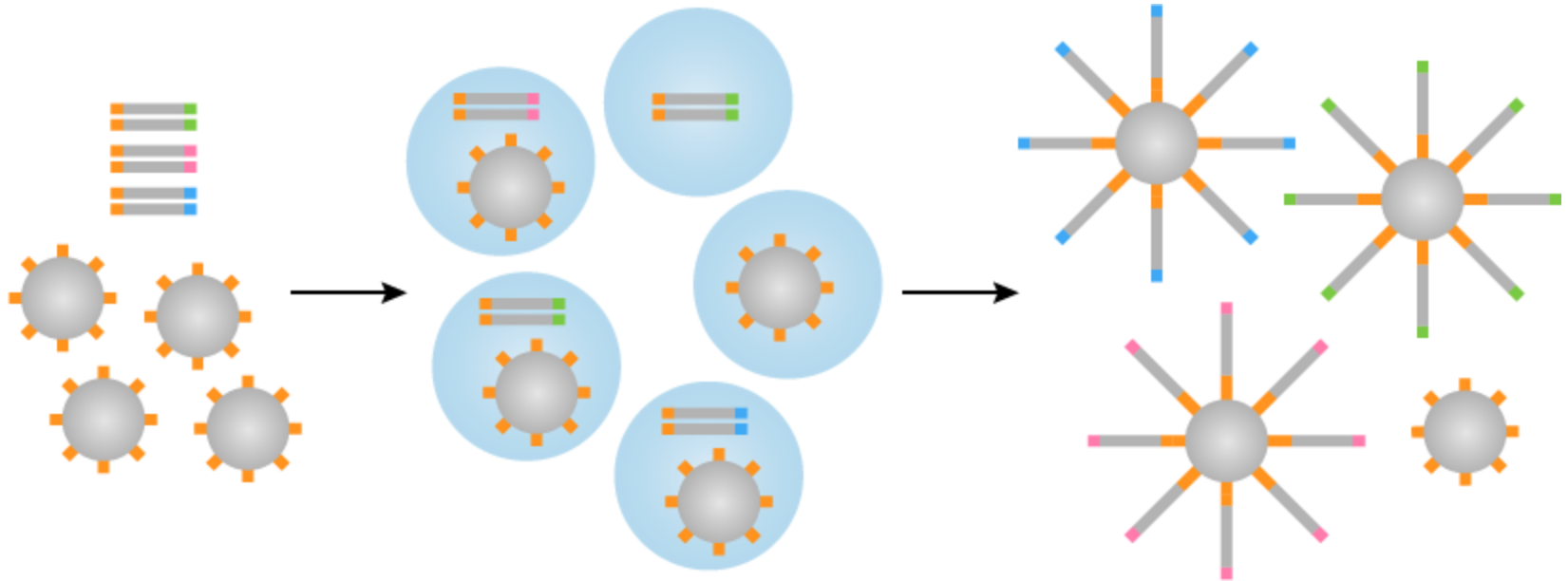
## **(3) Next generation sequencing – Giải trình tự thế hệ mới**

- Xây dựng library: phân các trình tự nucleic acid mẫu ra và gắn với adapter
- Khuếch đại: khuếch đại các trình tự (clone hay PCR)
- Do có sự hỗ trợ của máy móc, nên là nhiều lần chạy phản ứng Sanger cùng một lúc
- Giải chuỗi DNA ngắn: 50-70 nu

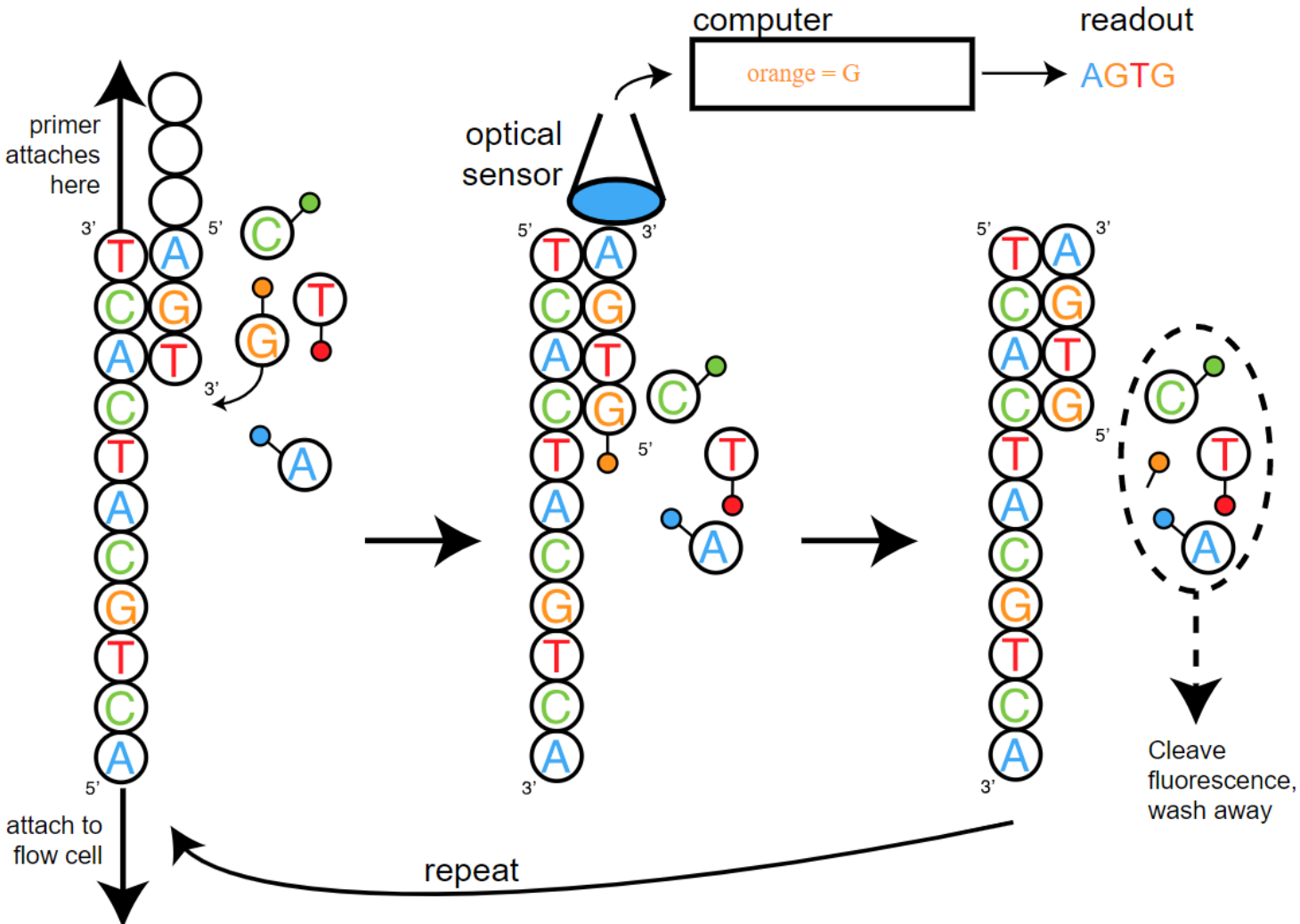
### **Một số kỹ thuật Giải trình tự thế hệ mới phổ biến:**

- Pyrosequencing
- Illumina – Giải trình tự tổng hợp (Sequencing by synthesis)
- Giải trình tự kết nối (Sequencing by ligation)
- Ion torrent: Proton / PGM sequencing

# Pyrosequencing

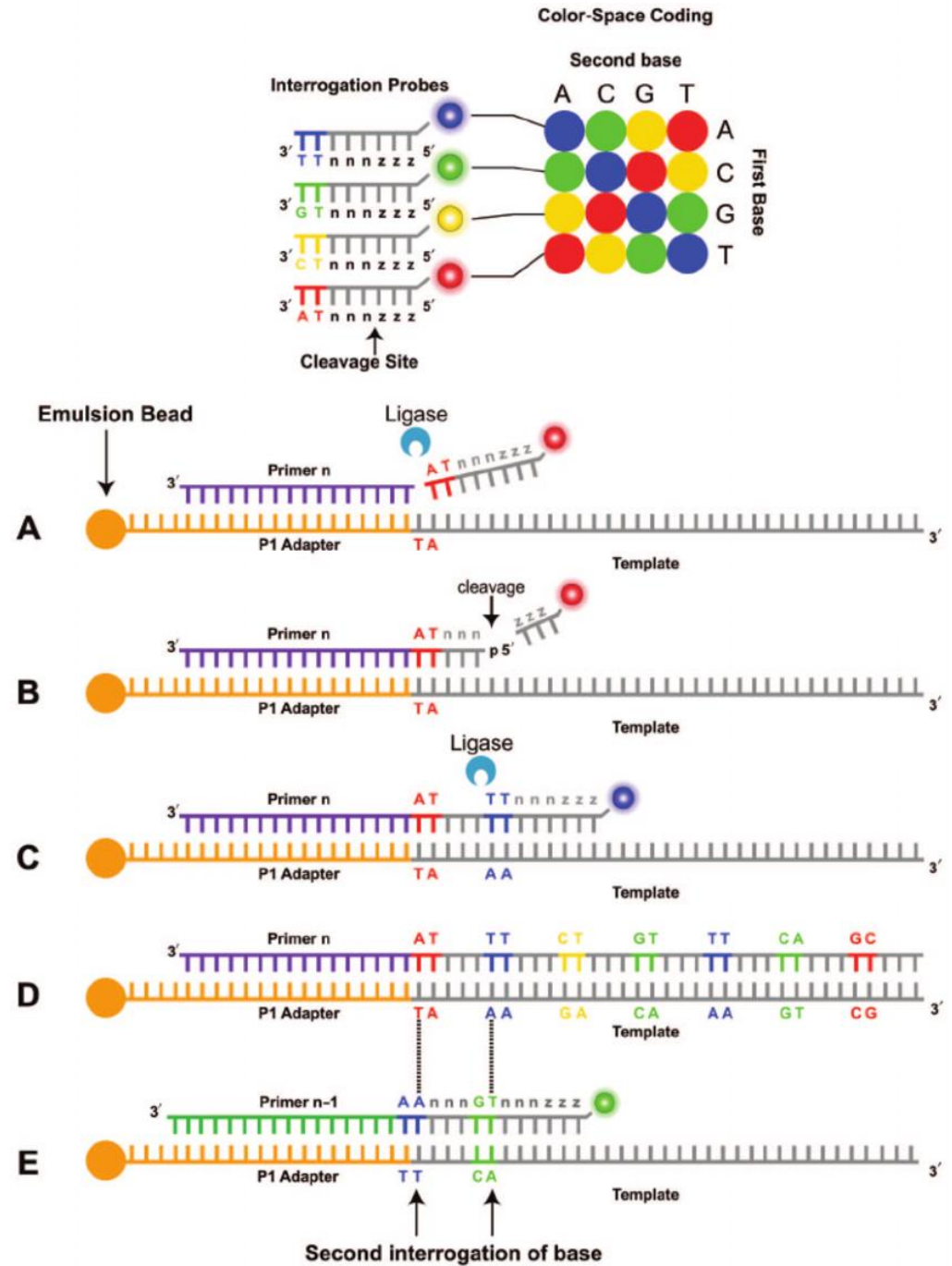


# Sequencing by synthesis

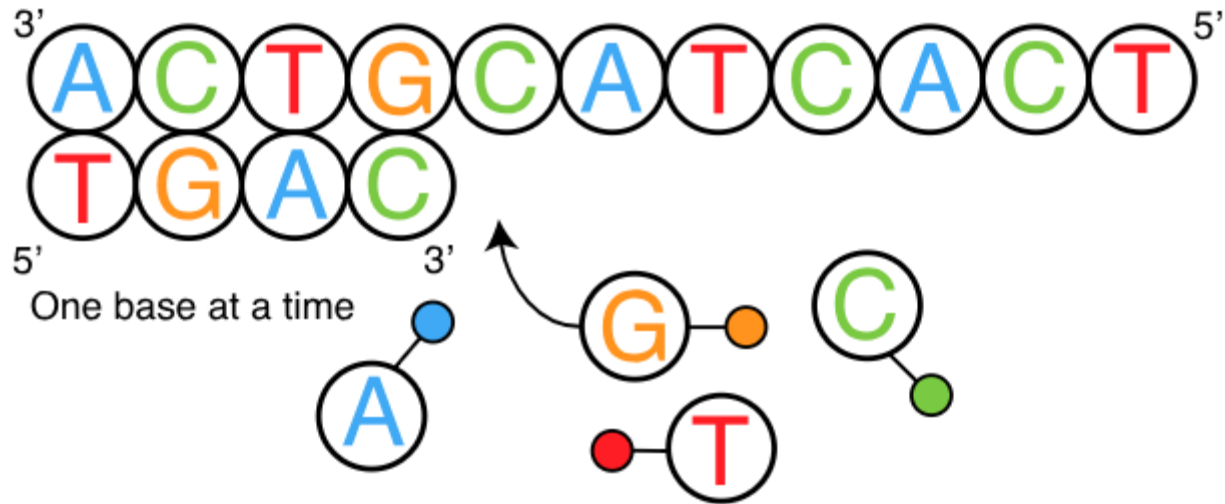


Sequencing by Synthesis. dNTP fluorescence is translated to a base call.

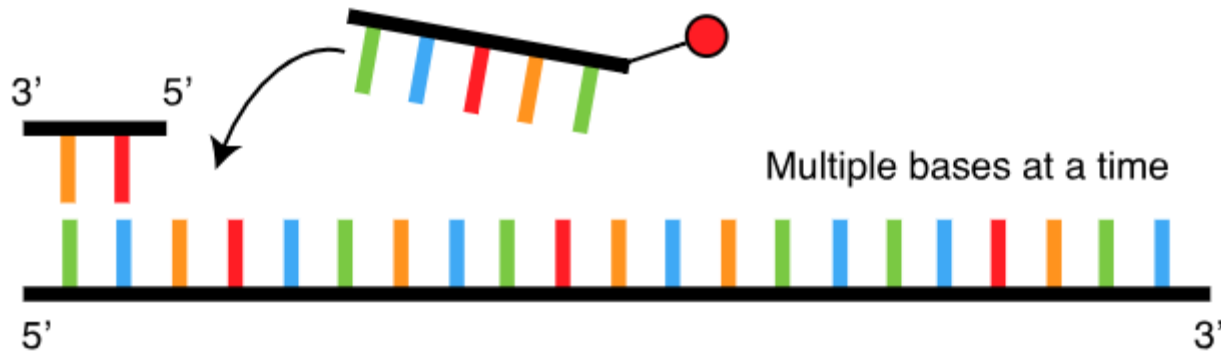
# Sequencing by ligation (SoLID)



## Sequencing by Synthesis

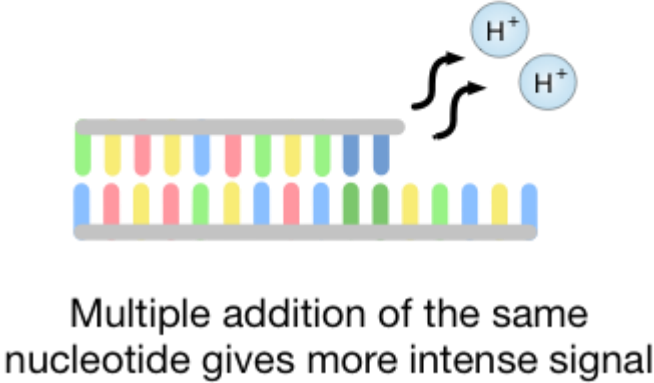
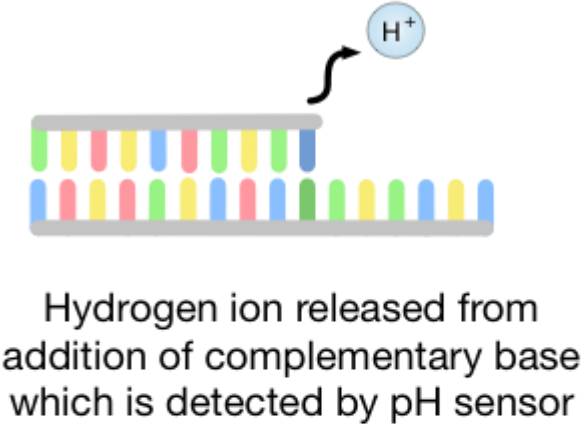
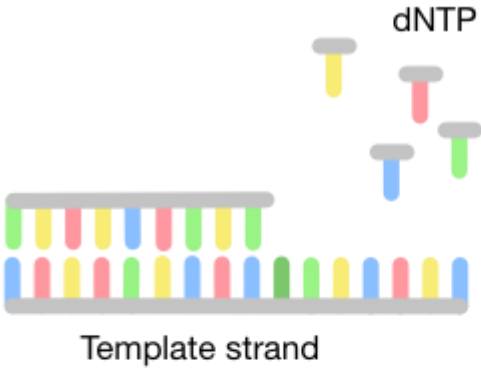


## Sequencing by Ligation



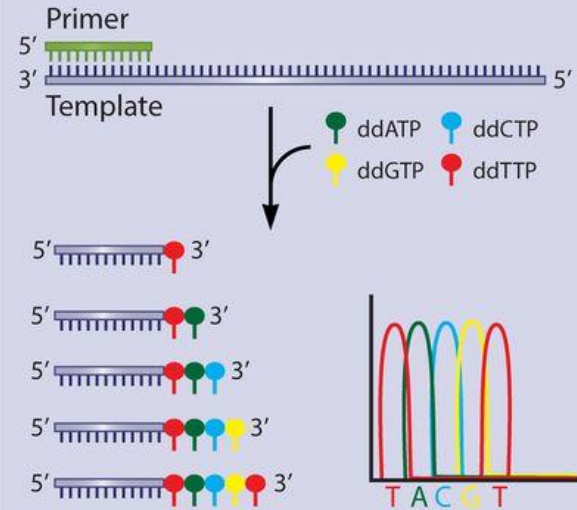
*Sequencing by synthesis vs. sequencing by ligation.*

# Ion Torrent (pH / Semiconductor) Sequencing





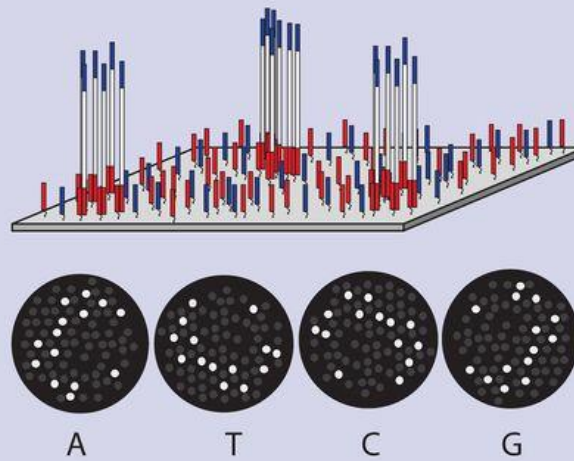
## First Generation Shotgun Sequencing



- Sequencing by synthesis
- High accuracy
- Long read lengths
- Relatively small amount of data generated

e.g., ABI capillary sequencer (ABI)

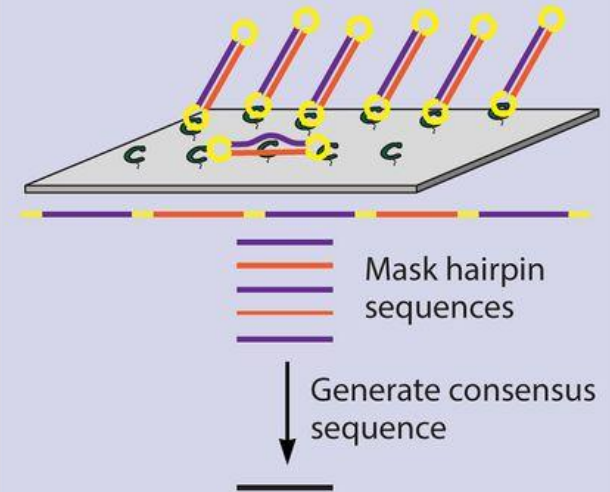
## Second Generation Massively Parallel Sequencing



- Sequencing by synthesis
- Amplified templates are generated during sequencing, reducing the requirements for starting material
- High accuracy
- Short read lengths

e.g., MiSeq (Illumina), Ion Torrent (Thermo Fisher Scientific)

## Third Generation Single-molecule Sequencing



- Single-molecule templates
- Low accuracy
- Long read lengths

e.g., Single-Molecule Real-Time (SMRT) — Sequencing (Pacific Biosciences), MinION (Oxford Nanopore Technologies)

# Ứng dụng

- Genome study
  - Hiểu thêm về các loại bệnh phức tạp
  - Nghiên cứu loài
  - Nghiên cứu đột biến
  - Chữa trị ung thư
- Giá thành:

## Illumina NextSeq500 sequencing

Service	Internal (Cornell and Cornell Affiliates)	External	External, NYSCAT subsidized (for-profit, New York State Companies ONLY)
75 bp sequencing kit (1x75 bp or 2x37 bp) run	\$1,375	\$2,200	\$1,760
150 bp sequencing kit (1x150 bp or 2x75 bp) run	\$2,650	\$4,240	\$3,392
300 bp sequencing kit (2x150 bp) run	\$4,225	\$6,760	\$5,408

# Tài liệu tham khảo

- <https://www.youtube.com/watch?v=9YxExTSwgPM>
- <https://youtu.be/jFCD8Q6qSTM>
- <https://tapchisinhhoc.com/giai-trinh-tu-gen-the-he-moi.html/>

# Một số câu hỏi

- Mục đích của việc giải trình tự DNA là gì?
- Vai trò của các dideoxynucleotide trong quá trình giải trình tự là gì?
- So sánh phương pháp PCR và giải trình tự DNA? (Giống nhau khác nhau, ưu nhược điểm như thế nào?)



# THANK YOU

Any question?

