

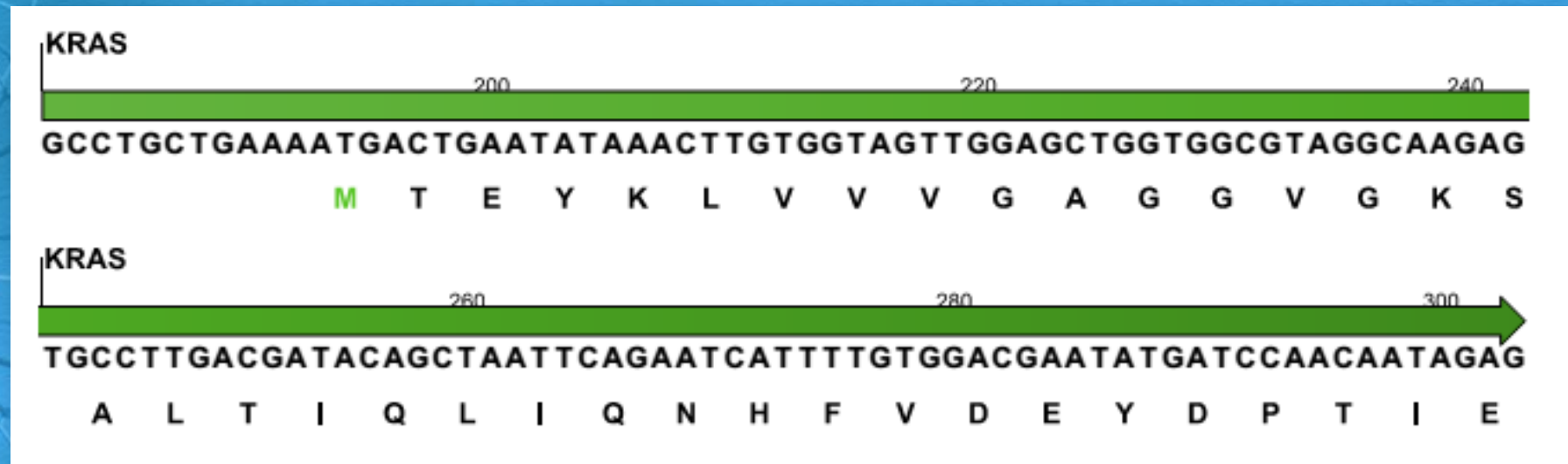


# GIẢI TRÌNH TỰ DNA

*TS. BS. Nguyễn Minh Hà*

*drnguyenminhha@gmail.com*

*BM Hóa Sinh – SHPT Y học – Trường ĐH Y PNT*



Trình tự nucleotide (trên) và acid amin (dưới)  
của một phần exon 2 gen KRAS người

# KT giải trình tự DNA/gen (DNA sequencing)

- Xác định trình tự các nucleotide của một đoạn/toàn bộ phân tử DNA đích
- Ứng dụng:
  - ✓ Xác định đột biến gen người, VSV
  - ✓ Tạo ngân hàng dữ liệu DNA các loài
  - ✓ Xác định các biến dị

- 
- Có 3 phương pháp được áp dụng để xác định trình tự gen:

- 1. Phương pháp Maxam and Gilbert**

- 2. Phương pháp Sanger**

- 3. Phương pháp Giải trình tự thế hệ mới  
(NGS, Next generation sequencing)**

# Phương pháp MAXAM & GILBERT

- A. M. Maxam và W. Gilbert-1977
- Trình tự nucleotide của chuỗi đơn hoặc chuỗi đôi DNA được xác định bằng cách xử lý với những chất hóa học đặc hiệu, giúp cắt đoạn DNA tại những vị trí nucleotide đặc hiệu.



**Table 10.1 Specific Base Reactions in Maxam-Gilbert Sequencing**

Chain breaks at:	Base Modifier	Reaction	Time (min at 25°C)
G	Dimethylsulphate	Methylates G	4
G + A	Formic acid	Protonates purines	5
T + C	Hydrazine	Splits pyrimidine rings	8
C	Hydrazine + salt	Splits only C rings	8

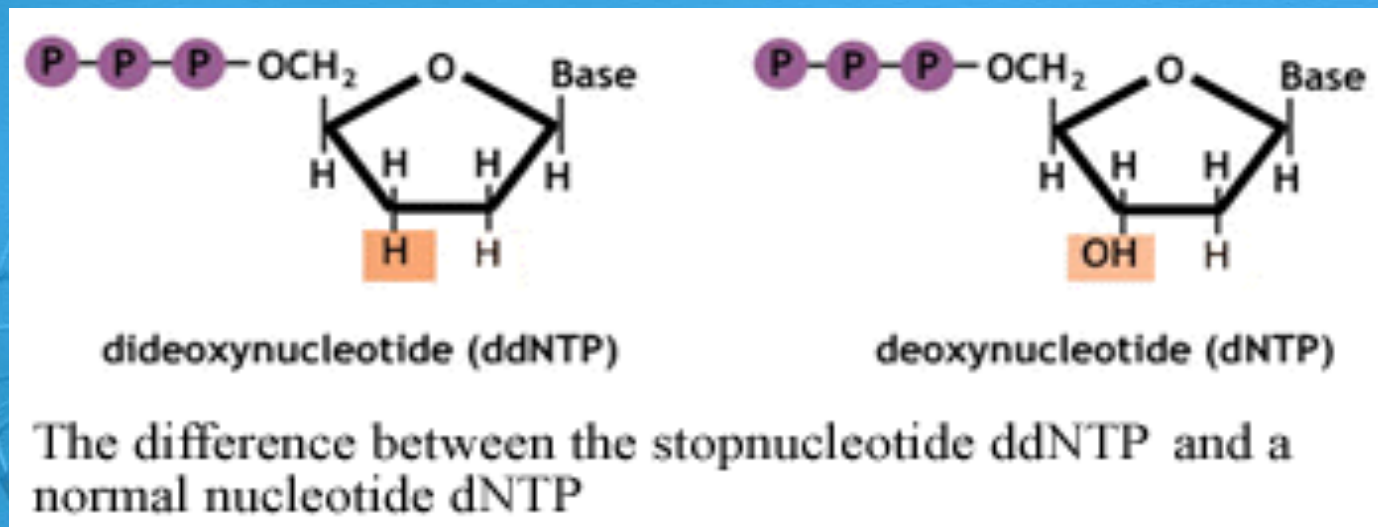
# Phương pháp SANGER (1)

- Được phát minh bởi Frederick Sanger (1977) và được giải Nobel 1980
- Được áp dụng bởi hầu hết các thiết bị và kỹ thuật giải trình tự DNA tiên tiến.
- Còn được gọi là phương pháp **dideoxy (chain termination)**
- Phục vụ Dự án Human Genome Project

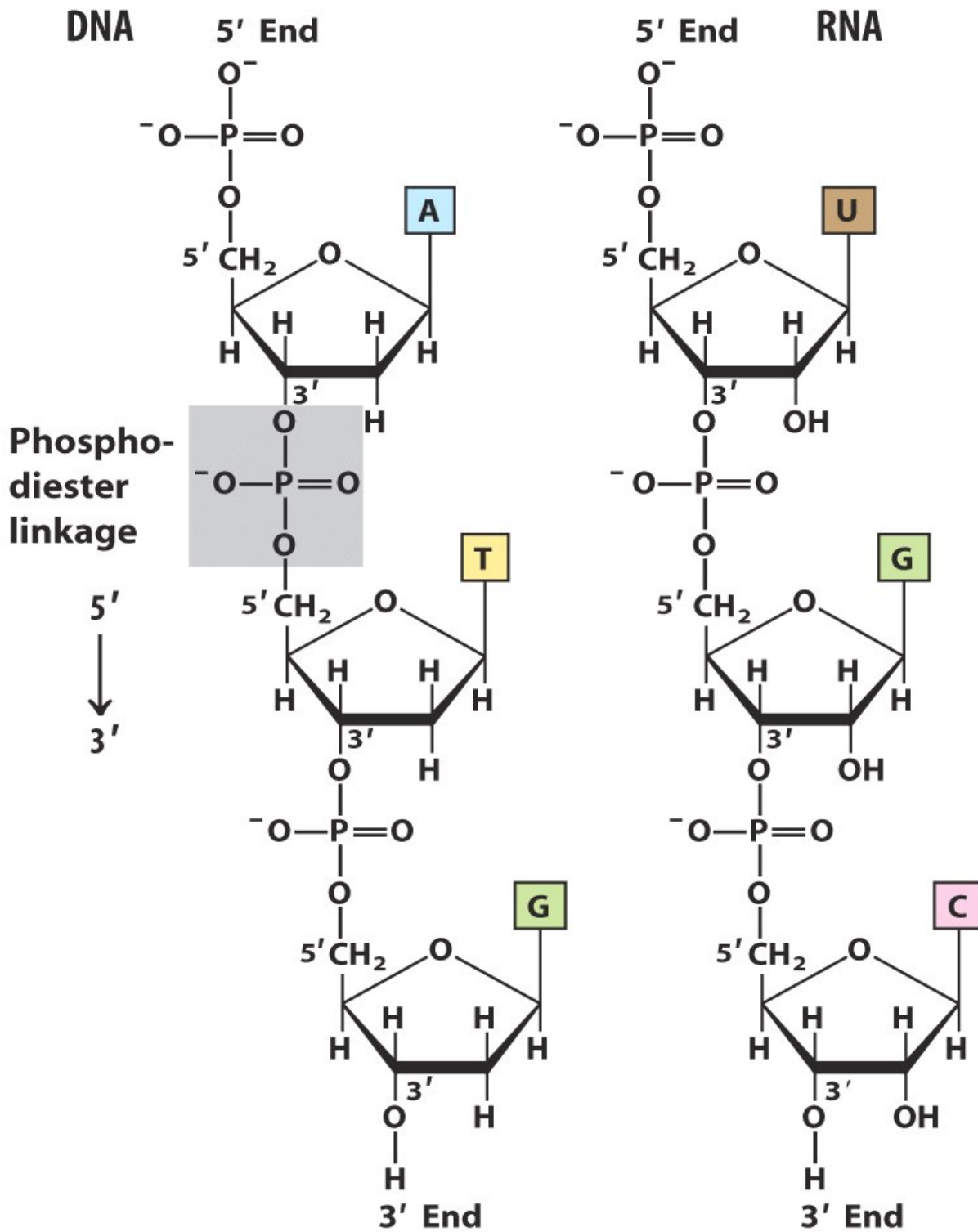


# Phương pháp SANGER (2)

- Sử dụng dideoxynucleotide triphosphates (ddNTPs) làm chất chấm dứt kéo dài chuỗi (chain terminators):



- Trong phản ứng tổng hợp, nếu 1 ddNTP được gắn vào chuỗi thay vì 1 dNTP, quá trình tổng hợp sẽ ngừng lại tại vị trí nucleotide đó vì -3'OH cần thiết cho sự gắn vào của nucleotide kế tiếp.





# Phương pháp SANGER <sup>(3)</sup>

## **NGUYÊN TẮC**

- Trình tự nucleotide của chuỗi đơn DNA được xác định bằng phương pháp kéo dài chuỗi bổ sung dưới tác dụng của enzym.
- Sự tổng hợp chuỗi này sẽ kết thúc tại từng vị trí nucleotide đặc hiệu
- Các đoạn polynucleotide có chiều dài khác nhau được phân tách bằng điện di trên gel
- Đọc trình tự DNA.

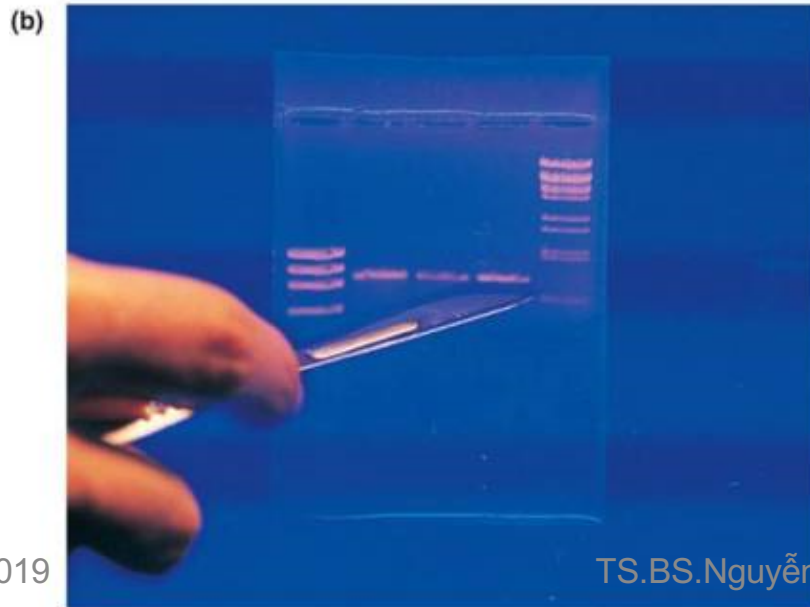
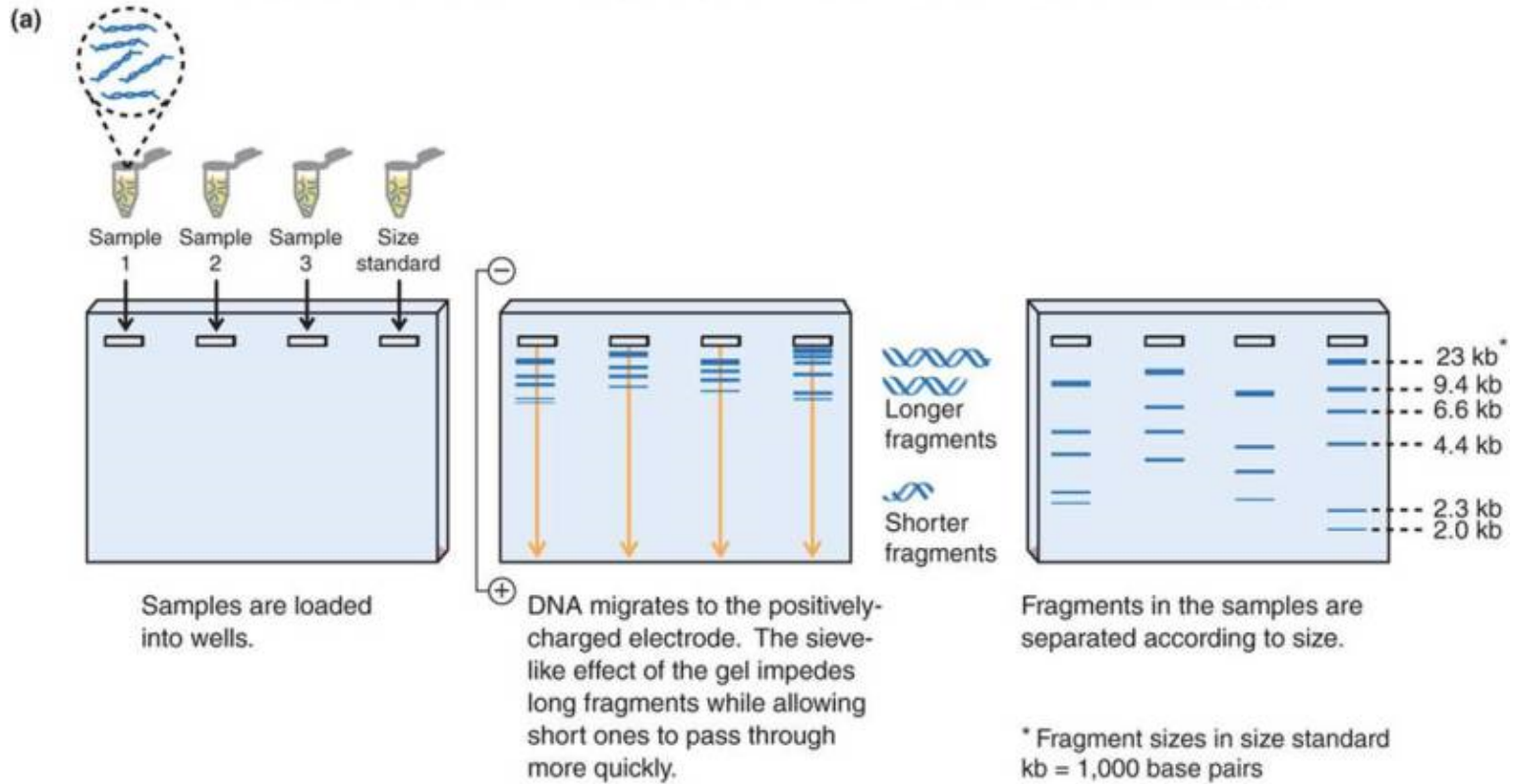
# Phương pháp SANGER (4)

## ***QUY TRÌNH***

1. Chuẩn bị DNA đích (PCR)
2. Tinh sạch DNA đích
3. Chạy phản ứng giải trình tự
4. Tinh sạch sản phẩm của phản ứng giải trình tự
5. Điện di để đọc kết quả

# ***CHUẨN BỊ DNA ĐÍCH***

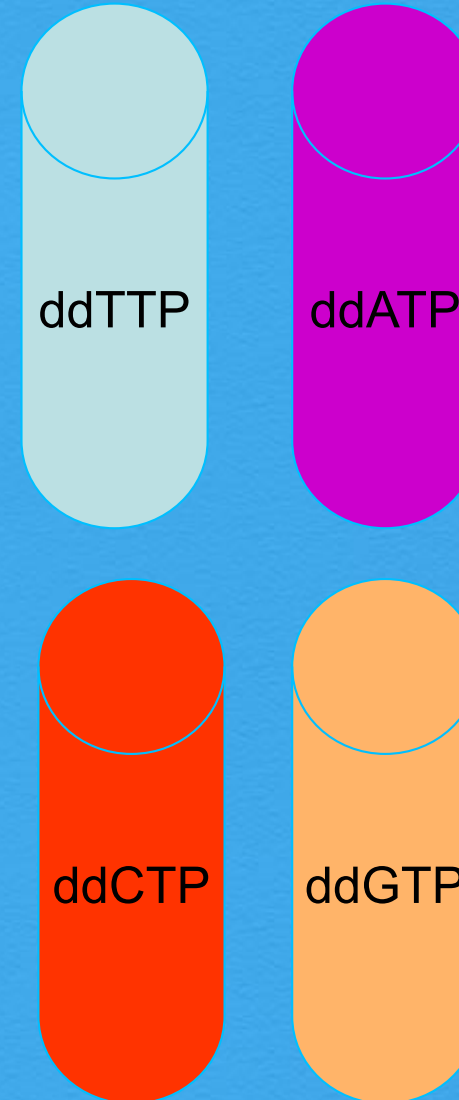
- Đoạn DNA đích có thể nằm trong DNA bộ gen
- Đoạn DNA đích có thể được gắn vào một vector plasmid hoặc vector thể thực khuẩn
- Đoạn DNA đích được khuếch đại nhờ PCR



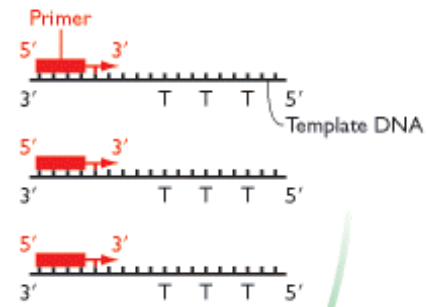
Sau khi điện di trên gel, cắt vị trí gel chứa đoạn DNA đích mong muốn đem đi tinh sạch

# PHẢN ỨNG GIẢI TRÌNH TỰ

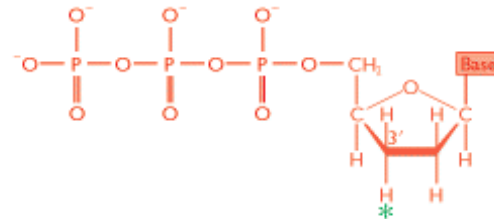
- Được thực hiện trong 4 tube riêng biệt, mỗi tube chứa:
  - ✓ DNA đích, sợi đơn
  - ✓ 1 Primer
  - ✓ dNTP (4 loại)
  - ✓ ddNPT (1 trong 4 loại)
  - ✓ DNA polymerase



(A) Initiation of strand synthesis

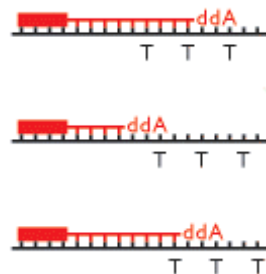


(B) A dideoxynucleotide



\* Position where the -OH of a dNTP is replaced by -H

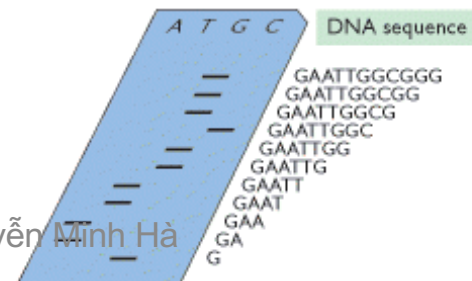
(C) Strand synthesis terminates when a ddNTP is added

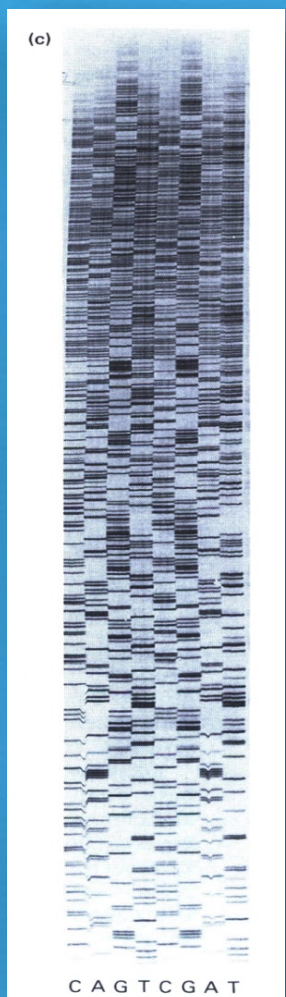
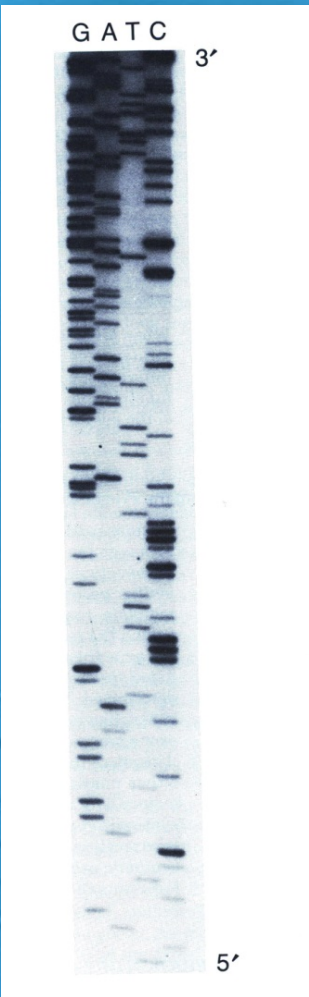
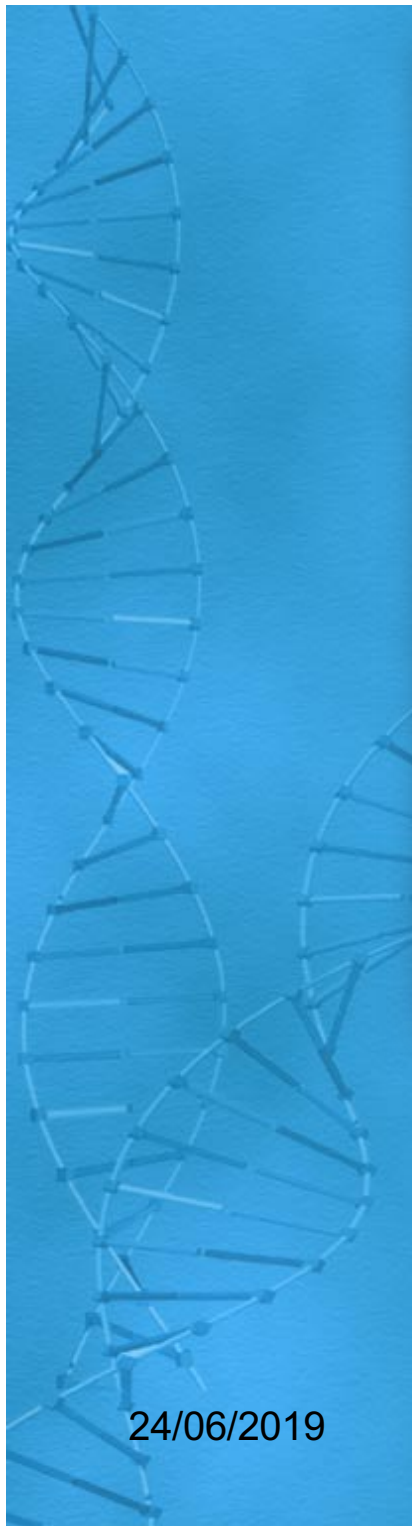


The 'A' family

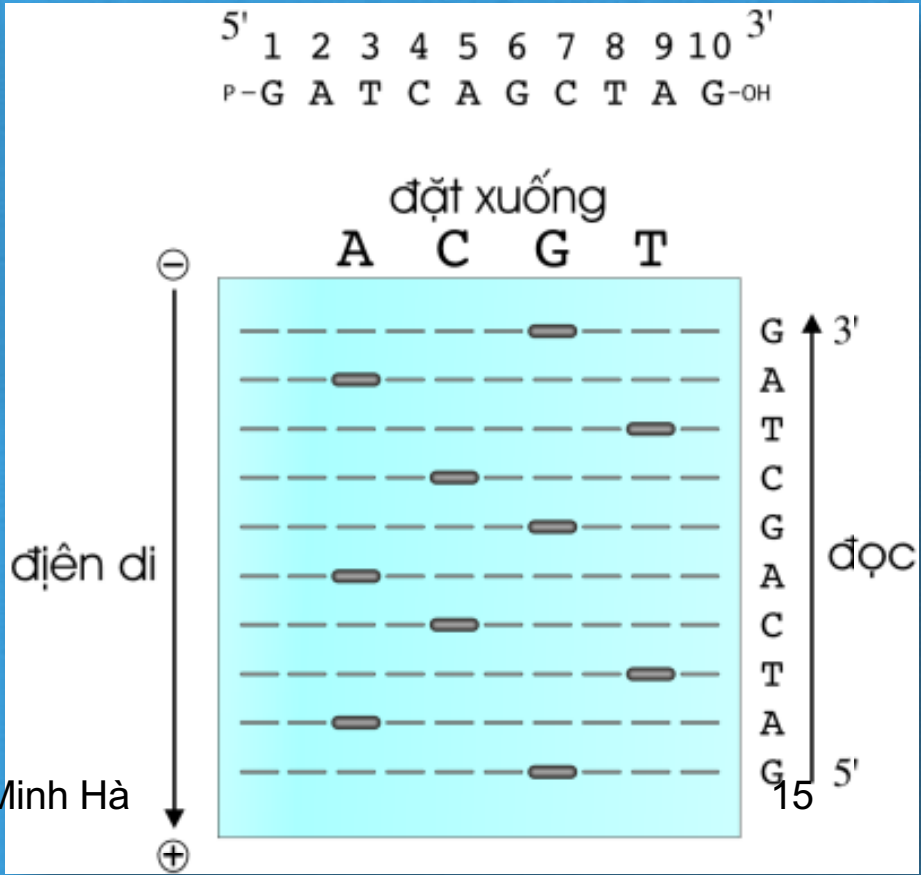


(D) The resulting autoradiograph

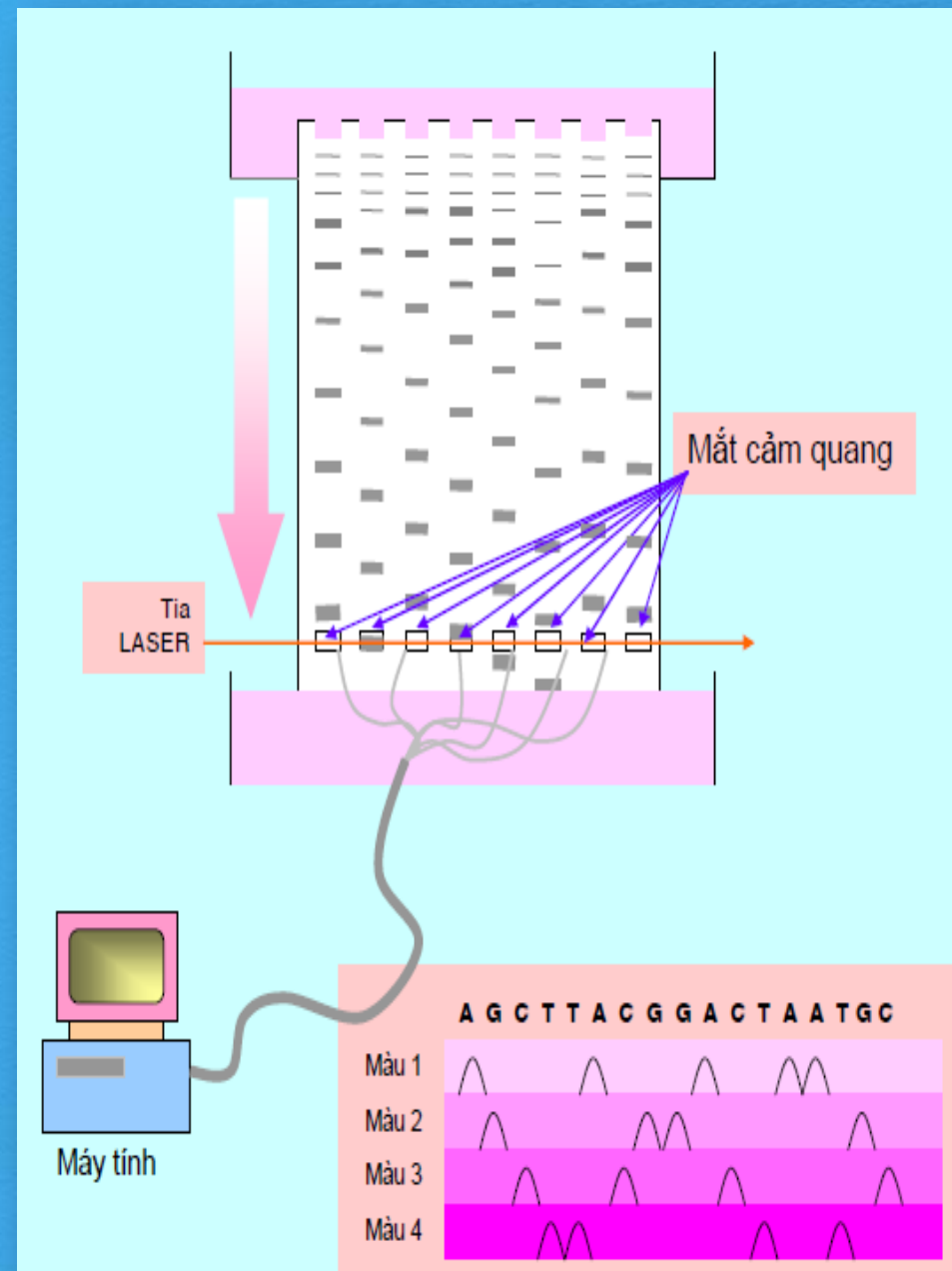
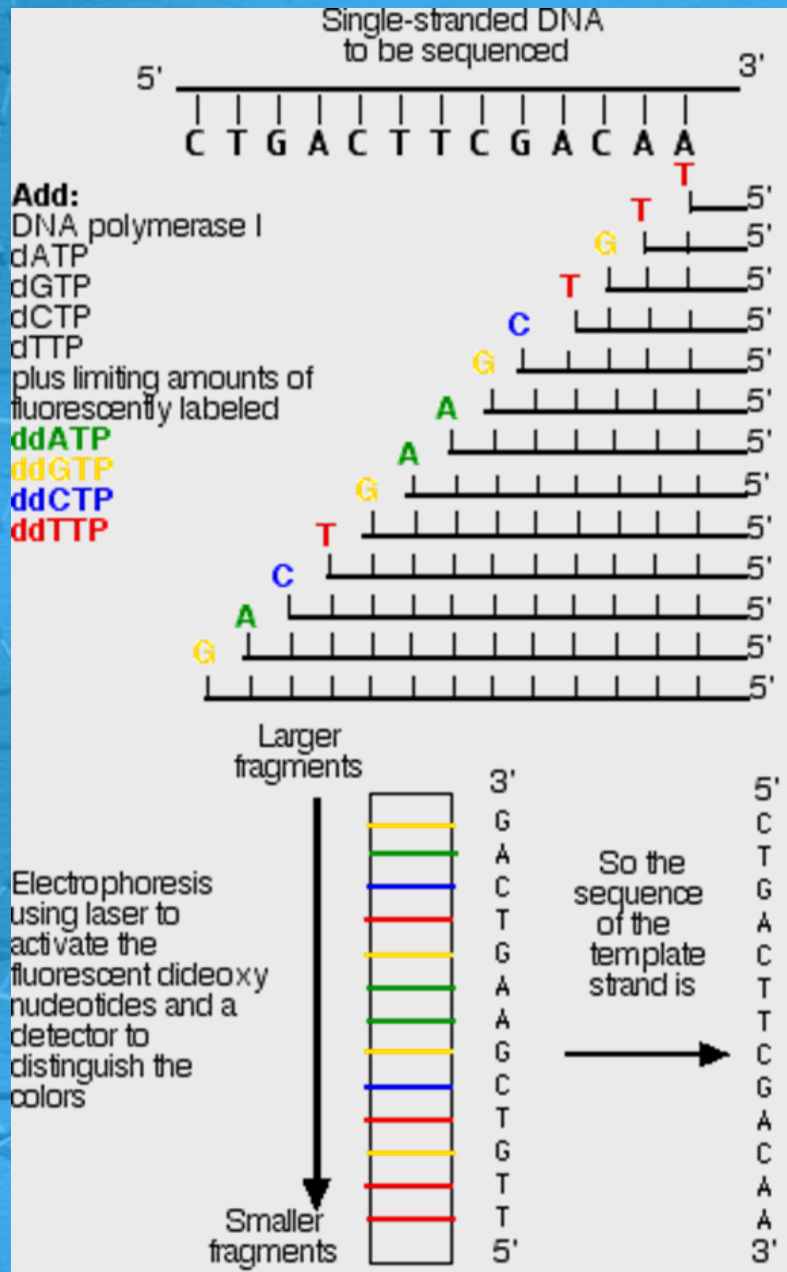




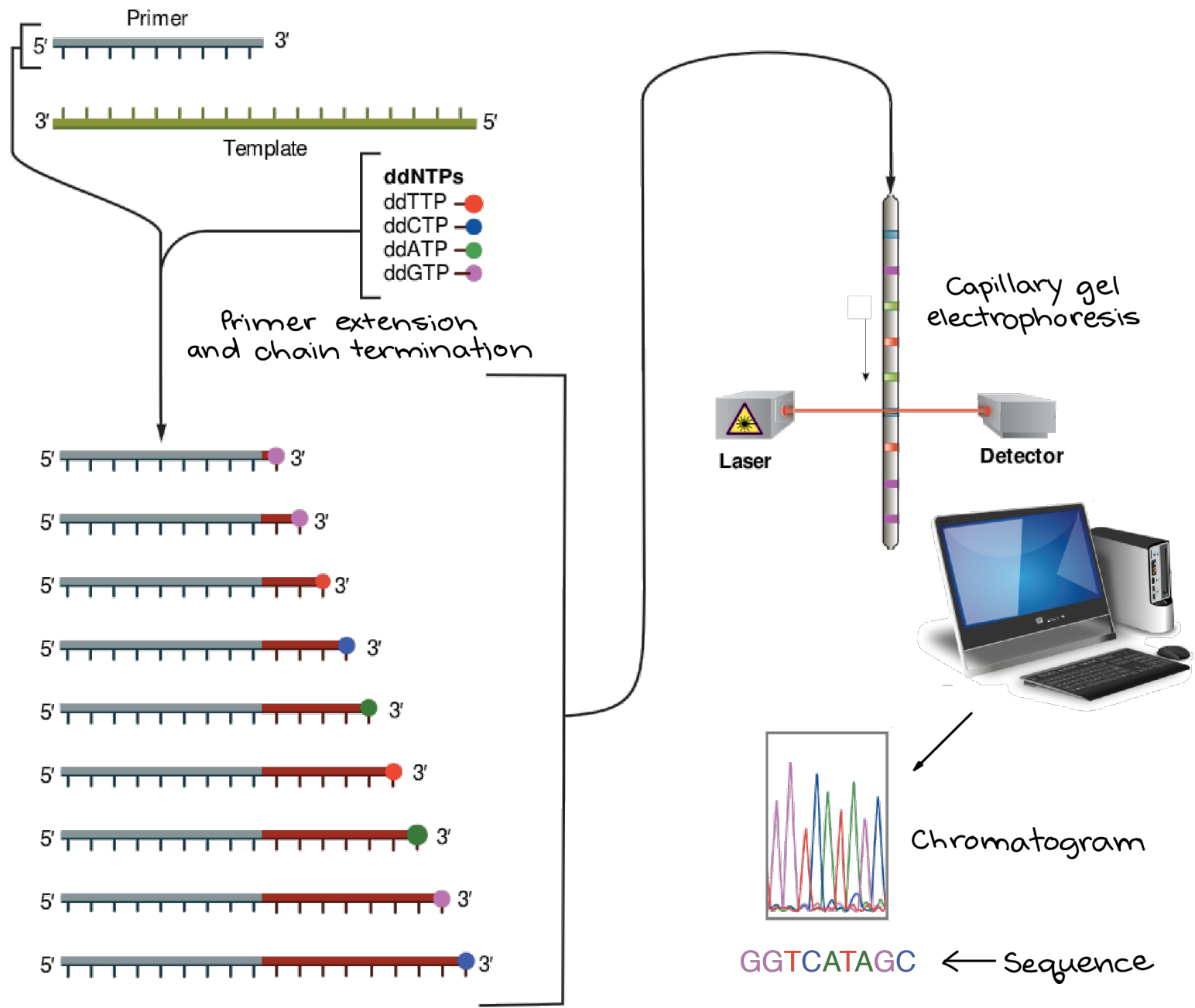
1978

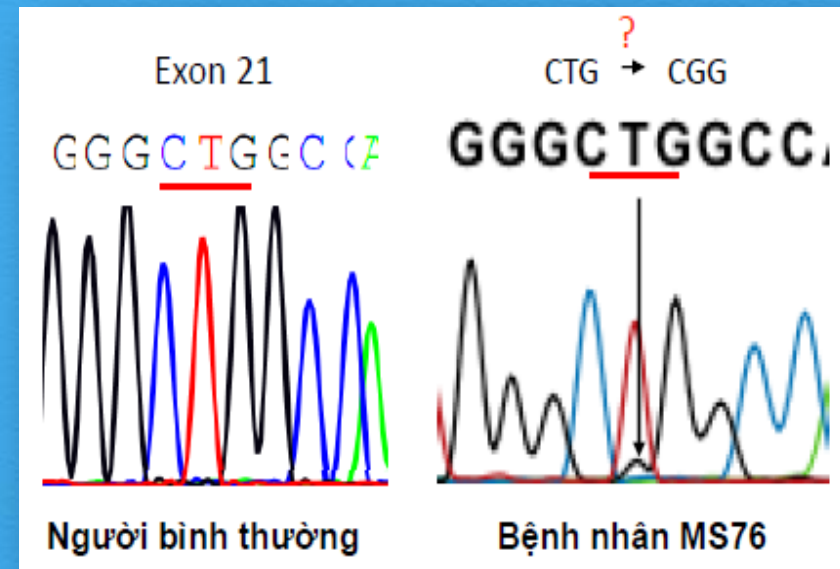
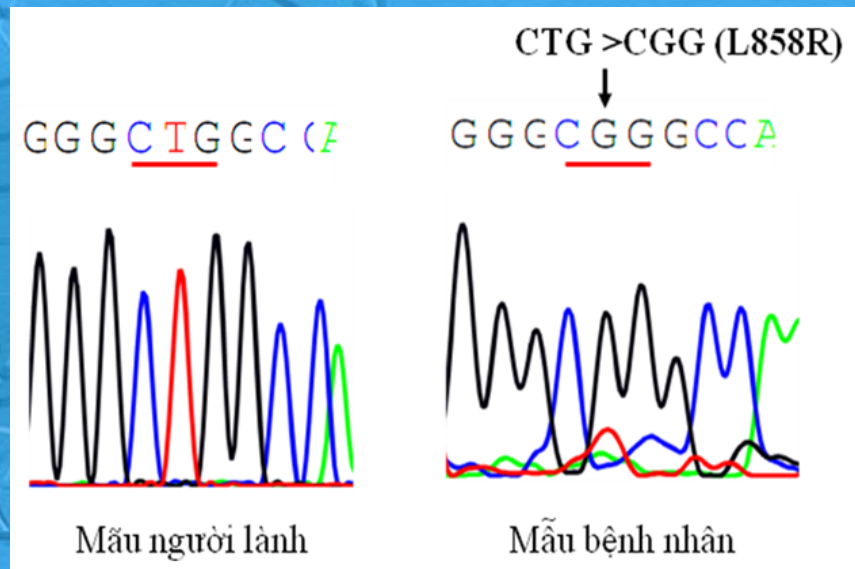
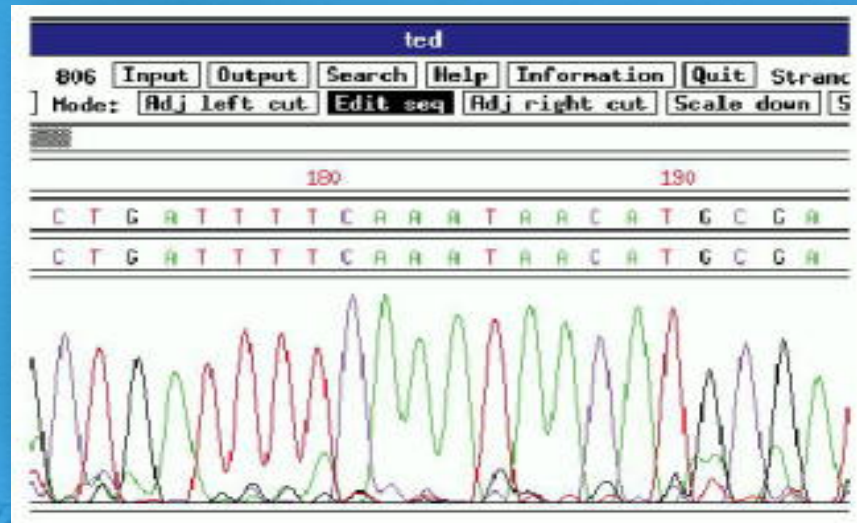


# Giải trình tự tự động (pp Sanger cải tiến)









# Phương pháp NGS (1)

## Sanger Seq

- is limited to determining the order of one fragment of DNA per reaction.
- up to a maximum length of \*700 bases
- Higher cost (# 2400 USD/Mb)
- >13 yrs, 6 billions USD for human genome

## NGS

- can sequence millions of DNA fragments in parallel in one reaction
- yielding enormous amounts of data
- Minimum cost (# 0,5 USD/Mb)
- 01 day, 1000 USD

# Phương pháp NGS (2)

Four steps of DNA sequencing:

- 1- Library Preparation
- 2- Cluster Generation
- 3- Sequencing
- 4- Data Analysis

[https://www.youtube.com/watch?v=ToKUGz\\_YhC4](https://www.youtube.com/watch?v=ToKUGz_YhC4)

<https://www.youtube.com/watch?v=mI0Fo9kaWqo>

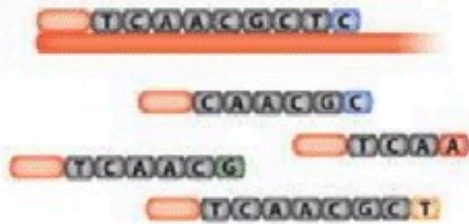
# genomic DNA

## Sanger Sequencing

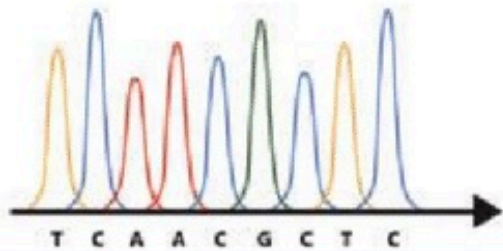
Amplification of region of interest by PCR



Chain termination PCR using fluorescently labeled ddNTPs



PCR fragments are separated based on size and the DNA sequence is read by the order in which fluorescent signals are detected

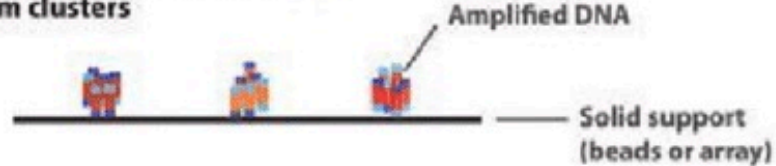


## Second Generation Sequencing

Shearing of genomic DNA and ligation of adaptors

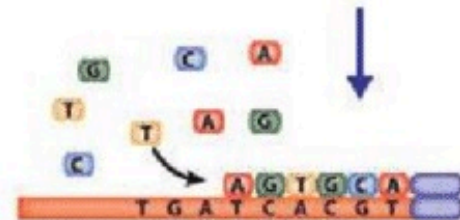


Hybridization of fragments to solid surface, followed by amplification of fragments to form clusters



Amplified DNA

Solid support (beads or array)



Fluorescently labeled nucleotides are incorporated while highly sensitive cameras record the sequence of lights

Sequence reads can be used for de novo assembly of the genomic sequence, or be mapped back to a known genome and quantitated

