

## Sequenziamento

Il sequenziamento del DNA è quel procedimento che permette di determinare l'ordine preciso dei nucleotidi in un segmento di DNA.

Ci sono varie tecniche, che possono essere suddivise in due grandi categorie:

**Metodo di terminazione della catena**, ideato da Sanger e colleghi a metà degli anni 1970.

**Piattaforme di sequenziamento di nuova generazione, NGS**, sono tecniche che utilizzano il sequenziamento in parallelo di un ampio numero (milioni) di sequenze di DNA. Introdotte sul mercato nel 2005.

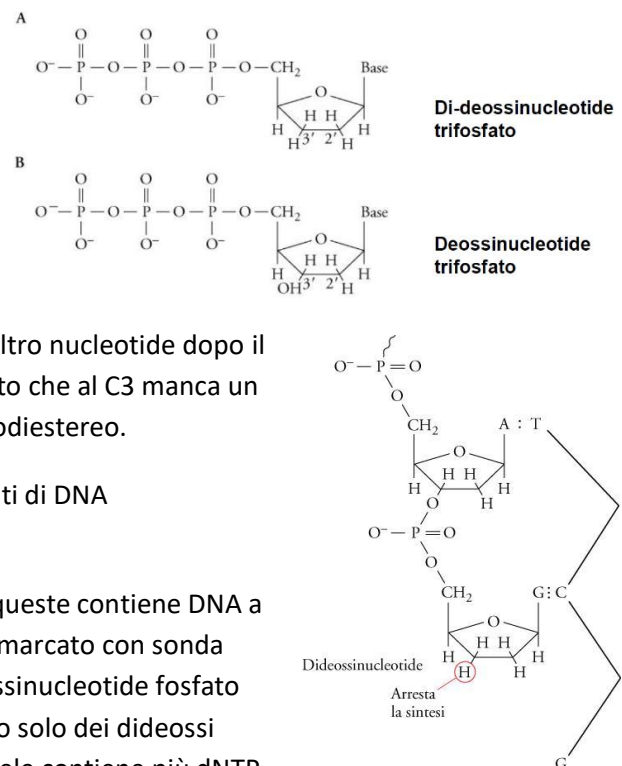
### Metodo di Sanger (sequenziamento con di-deossinucleotidi)

In questa tecnica si usano Di-deossinucleotidi trifosfato, che si differenziano per avere sia al C2 che al C3 dello zucchero due sostituenti H, invece che avere un H ed un OH al C3 come il Deossinucleotide fosfato.

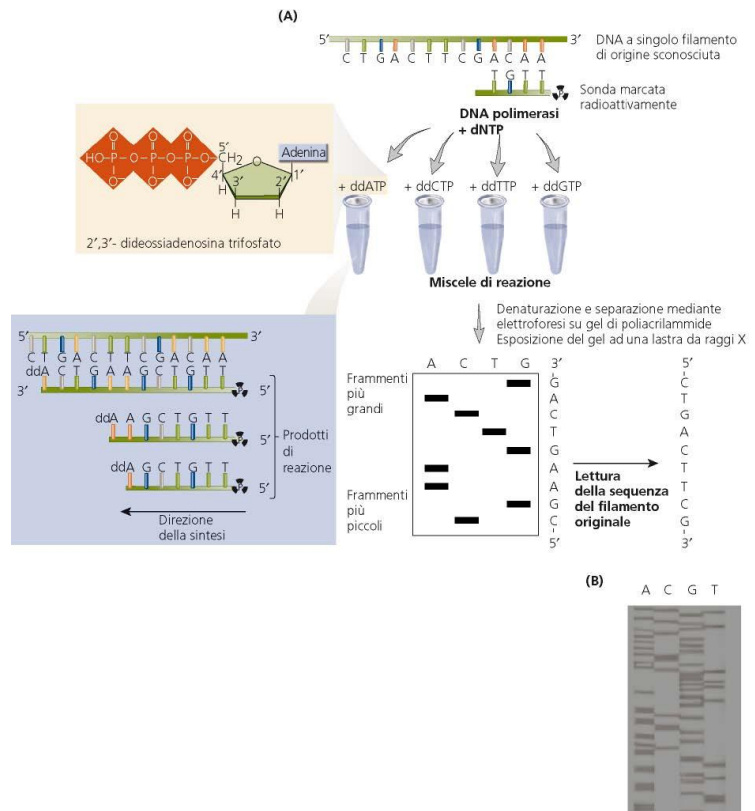
I di-deossinucleotidi trifosfato possono essere incorporati come dei normali nucleotidi dalla polimerasi. Quando però la polimerasi vuole legare un altro nucleotide dopo il di-deossinucleotide questa operazione è impedita dal fatto che al C3 manca un gruppo OH che permette la formazione del legame fosfodiesterico.

La tecnica di Sanger comporta la sintesi di nuovi filamenti di DNA complementari ad uno stampo a singolo filamento.

Si procede allestendo 4 miscele di reazione. Ognuna di queste contiene DNA a singolo filamento con sequenza sconosciuta, un primer marcato con sonda radioattiva o fluorescente, la DNA polimerasi ed i 4 deossinucleotide fosfato dNTP. In ciascuna miscela di reazione verrà aggiunto uno solo dei dideoxi nucleotidi trifosfato ddNTP. Dato che ognuna delle miscele contiene più dNTP che ddNTP, il blocco dell'allungamento della catena causato dall'ingresso del ddNTP nella sequenza non avverrà sempre nello stesso punto, ma avverrà in punti diversi, con la formazione di catene di lunghezza diversa.



Effettuato l'allungamento nelle 4 miscele di reazione, ognuna con un ddNTP, queste vengono denaturate per separare i filamenti di DNA e ciascuna verrà inserita in una colonna diversa di un gel per l'elettroforesi. Il gel di poliacrilammide per l'elettroforesi funge da setaccio molecolare e permette di separare le catene di lunghezza diversa in bande visibili grazie al marcatore, con precisione di 1 nucleotide. Dopo l'elettroforesi sarà possibile leggere la sequenza sul terreno di elettroforesi, grazie al fatto che vengono separate sequenze che differiscono di un solo nucleotide.



Se i pozzetti per l'elettroforesi sono stati caricati nella parte alta della piastra, i frammenti più piccoli si troveranno nella parte più in basso, quindi la lettura della sequenza inizia proprio dal basso.

Si riescono a leggere sequenze fino a circa 700 basi.

Il metodo classico usa ddNTP marcati invece del primer, insieme alla miscela di dNTP non marcati.

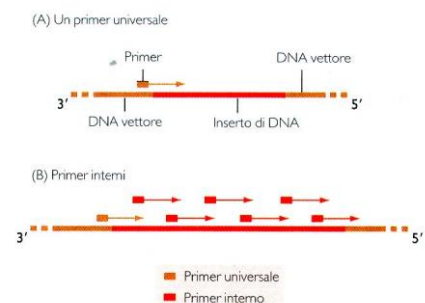
Il metodo di sequenziamento di Sanger richiede quindi uno stampo di DNA a singolo filamento.

Il primer stabilisce la regione di DNA stampo che verrà sequenziata.

Si utilizzano polimerasi prive di attività eso 3'-5' (che altrimenti rimuoverebbero il ddNTP che fa terminare la catena) e dotate di elevata processività (per sintetizzare frammenti di DNA più lunghi), come la *Taq* polimerasi.

La sequenza di DNA stampo è in genere integrata in un plasmide, in modo da usare primer standard (complementari al vettore in prossimità del sito di inserzione del frammento di DNA) che permettono la replicazione di qualunque sequenza inserita nel vettore).

Se il frammento da sequenziare è molto lungo, oltre le 900 basi circa, sarà necessario utilizzare dei primer interni, che si appaiano all'interno del frammento. Questo può essere fatto in sequenziamenti successivi, dove ogni lettura permette di scegliere un primer interno adatto che si appaierà alla sequenza sequenziata e da lì proseguirà, permettendo di leggere sequenze lunghe in più step.



**Figura 4.5** Diversi tipi di primer per il sequenziamento a terminazione di catena.

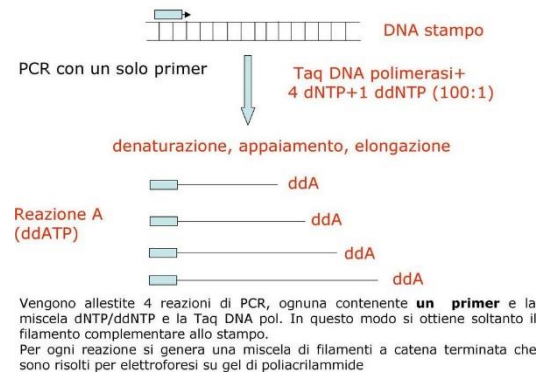
(A) Un primer universale si appaia al DNA vettore, in una posizione adiacente a quella nella quale viene inserito il nuovo DNA. Un singolo primer universale può quindi essere utilizzato per sequenziare qualsiasi inserto di DNA, ma fornisce la sequenza di una sola estremità dell'inserto. (B) Un modo per ottenere una sequenza più lunga consiste nell'effettuare una serie di saggi di sequenziamento, ciascuno con un primer interno diverso che si appaia all'interno dell'inserto.

## Sequenziamento a ciclo termico

Il metodo di terminazione della catena che sfrutta la polimerasi Taq è detto sequenziamento a ciclo termico.

Si parte da una miscela contenente il DNA stampo. Si usa un solo primer. Nella miscela di reazione si aggiunge la Taq DNA polimerasi, i 4 dNTP ed 1 dei quattro ddNTP in rapporto 100:1. Si ottengono quindi 4 miscele di reazione, una per ognuno dei quattro ddNTP.

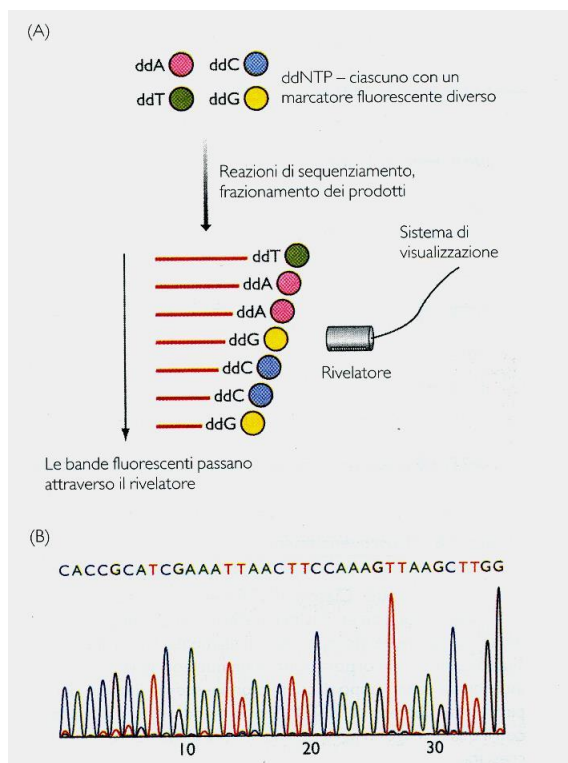
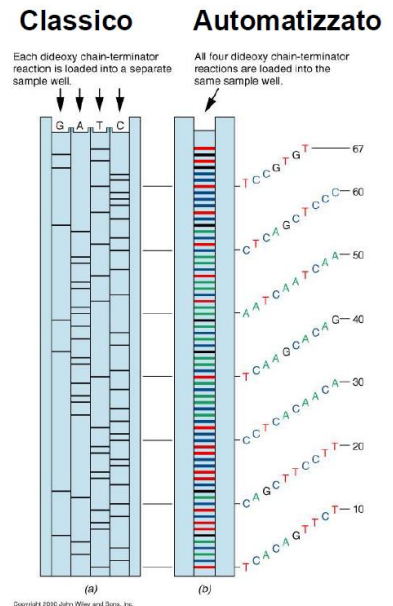
Si eseguono quindi i tre passaggi di **denaturazione**, **appaiaamento** ed **elongazione** in più cicli. I prodotti si accumuleranno linearmente data la presenza di un solo primer, e non esponenzialmente come nella PCR.



Si genererà così una miscela di frammenti di DNA a catena terminata che verranno poi risolti mediante elettroforesi in gel di poliacrilammide.

## Sequenziamento automatizzato

La procedura di sequenziamento di Sanger è stata automatizzata. A questo scopo si usano dideoossinucleotidi legati a marcatori fluorescenti. Ciascun ddNTP è marcato con un marcatore fluorescente diverso. I prodotti del ciclo termico vengono caricati in un singolo pozzetto di elettroforesi o su un singolo tubo di un sistema di elettroforesi capillare.



La miscela può essere caricata tutta insieme nell'elettroforesi perché in questo caso ci sono quattro marcatori diversi, uno per ogni ddNTP, che permettono di discriminare il nucleotide terminale.

Il campione viene letto da un rivelatore ottico di fluorescenza, ed i dati ottenuti vengono elaborati da un computer che restituisce la sequenza letta dal rivelatore.