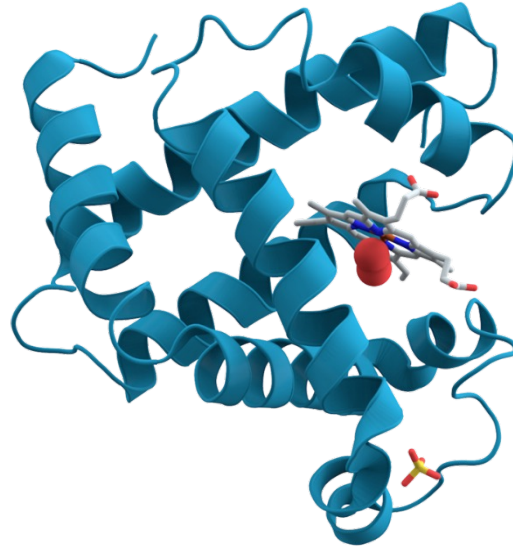
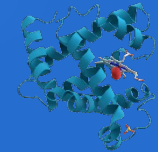




18.03.2026

Curs 5 – Structura acizilor nucleici

Structura chimică a ADN-ului



- în 1869 Friedrich Miescher izolează din nucleu o substanță albă pe care o denumește **nucleină**. Datorită caracterului ușor acid capătă mai apoi denumirea de **acid nucleic**.
- funcția și structura acestei substanțe rămâne necunoscută până în jurul anilor 1920.

Acizii nucleici sunt **polimeri** rezultați în urma legării prin **legături fosfodiesterice** unui număr mare de **nucleotide**. Funcție de tipul de nucleotide, acizii nucleici se clasifică în:

- **acid ribonucleic (ARN)** – conține în structura sa riboză;
- **acid dezoxiribonucleic (ADN)** - conține în structura sa deoxiriboză;

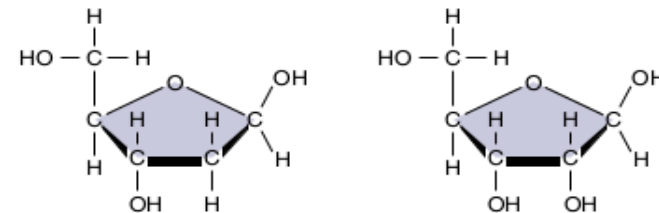
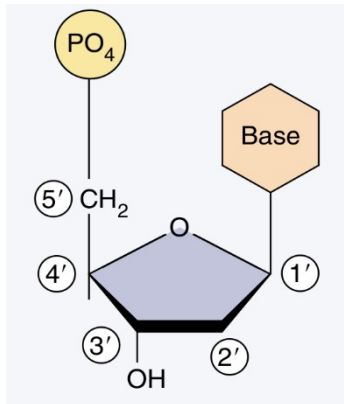
O **nucleotidă** este alcătuită din

- un **glucid** cu 5 atomi de C (**riboza sau deoxiriboza**) în formă furanozică;
- o **grupare fosfat (PO₄)** legată de atomul C 5 al glucidului;
- **bază azotată** legată de atomul C1 al glucidului;

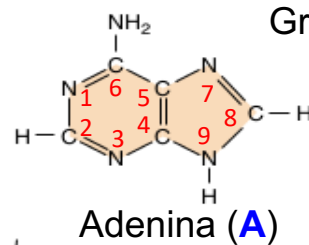
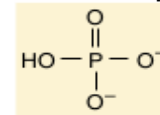
Bază azotată se leagă printr-o legătură glicozidică de pentoză formând un **nucleozid**. **O nucleotidă se definește astfel ca fiind un ester fosforic al nucleozidului corespunzător.**

În acizii nucleici se întâlnesc două tipuri de baze azotate:

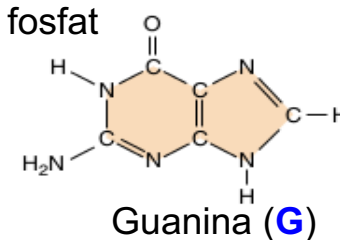
- **purinice** - două heterocicluri cu N: **Adenina (A)** și **Guanina (G)** în ADN și ARN
- **pirimidinice** – un heterociclu cu N: **Citozină (C)** și **Timină (T)** în ADN și **C** și **Uracil (U)** în ARN



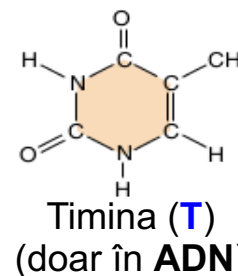
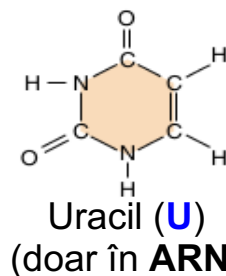
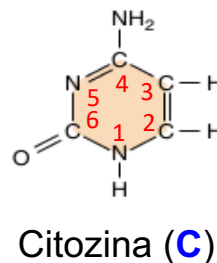
2'-dezoxi-β-D-ribofuranoză-β-D-ribofuranoză (**ARN**)
(**ADN**)



Grupă fosfat

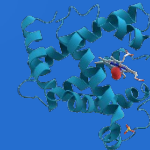


Purine (R)

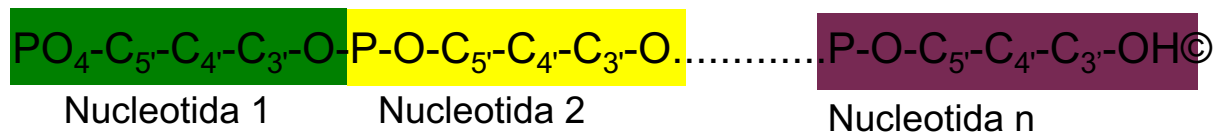


Pirimidine (Y)

Structura primară a ADN-ului



Între gruparea $-PO_4$ de pe carbonul 5 (poziția 5') al unei nucleotide și gruparea $-OH$ de pe carbonul 3 (poziția 3') al altei nucleotide se poate elimina o moleculă de apă cu formarea unei **legături fosfodisterice** ($-O-P-O-$). Se pot astfel forma astfel catene lungi de nucleotide al căror schelet are structura:



Aproape toate moleculele de ADN au două capete diferite:

- capătul 3' cu o grupare $-OH$ liberă;

- capătul 5' cu o grupa $-PO_4$ liberă.

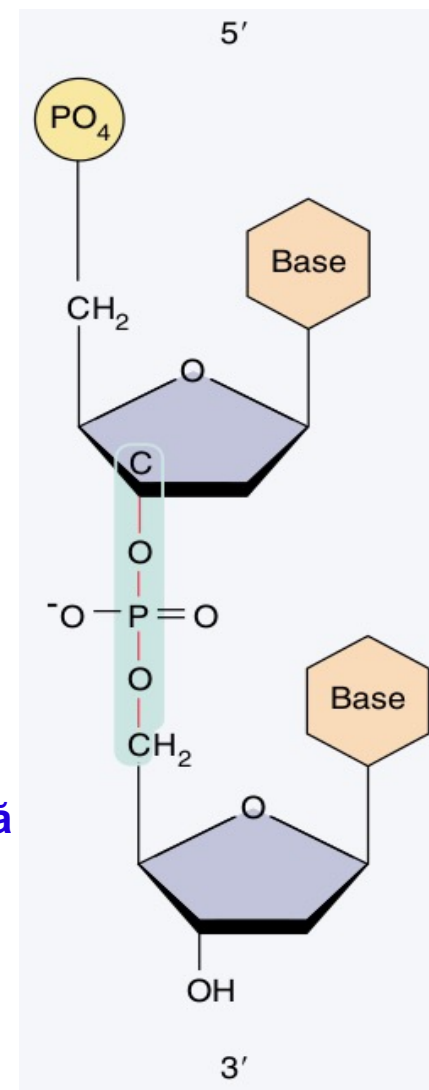
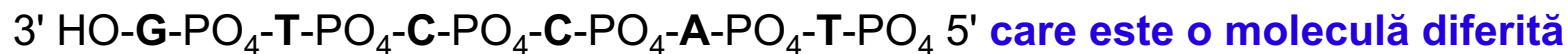
Ce molecule de ADN nu respectă această regulă?

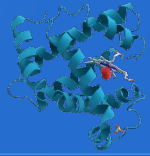
Prin convenție, secvența de nucleotide a ADN-ului se notează în direcția 5' → 3'

Secvența de nucleotide **GTCCAT** se referă la o catenă cu structura:



Și nu la





Compoziția în baze azotate a ADN-ului

Analiza lui Chargaff privind compoziția în baze azotate a ADN-ului

Organism	Procente molare			
	A	T	G	C
<i>Escherichia coli</i> tulpina K12	26.0	23.9	24.9	25.2
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	15.1	14.6	34.9	35.4
Drojdia de bere	31.3	32.9	18.7	17.1
Hering	27.8	27.5	22.2	22.6
Șobolan	28.6	28.4	21.4	21.5
Om	30.9	29.4	19.9	19.8

De ce procentele nu sunt perfect egale?

Regulile lui Chargaff:

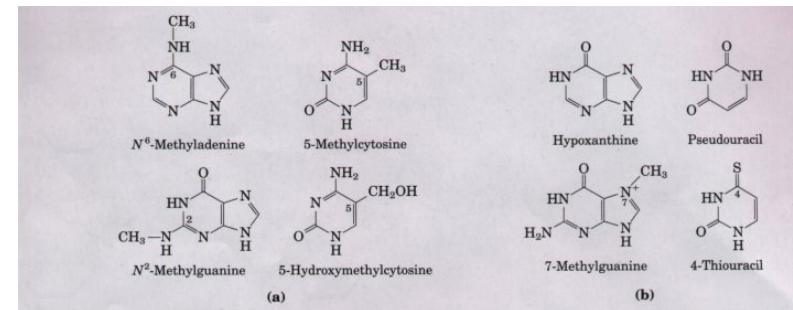
Într-o moleculă de ADN au loc întotdeauna următoarele relații:

- proportia de A este întotdeauna egală cu cea de T, iar cea de G cu cea de C

$$A=T; G=C$$

- proportia de baze azotate purinice este întotdeauna egală cu cea de baze pirimidinice

$$A+G=T+C$$



ADN

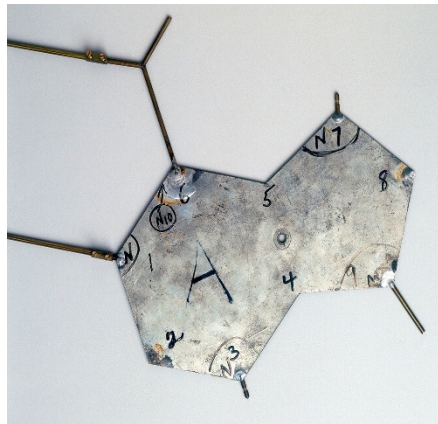
ARN

Structura tridimensională a ADN-ului

- Analizând modul în care razele X sunt difractate de o fibră cristalizată de ADN, **Franklin** propune în 1953 că **molecula de ADN are forma de tirbușon**, cu diametrul de 2 nm și o spiră de 3.4 nm;
- Watson and Crick** propun în 1953 un model al structurii ADN-ului ce are la bază un **dublu helix**;



Watson, J. D. & Crick, F. H. C. Molecular structure of nucleic acids: A structure for deoxyribose nucleic acid. Nature 171, 737–738 (1953)



Rosalind Elsie Franklin
(1920 - 1958)

Wilkins Maurice (1916 - 2004)

equipment, and to Dr. G. E. R. Duncanson and the captain and officers of R.R.S. *Discovery II* for their part in making the observations.

* Young, T. R., Duncanson, G., and Jones, W., *Phil. Mag.*, 48, 149 (1954).

* Longmire, M. S., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 50, 100 (1949).

* Van Arman, W. S., *Woods Hole Papers in Phys. Oceanogr. Meteor.*, 11 (1950).

* Elkanov, V. W., *Acta. Sci. Nat. (Math. Phys.)*, 2 (1955).

MOLECULAR STRUCTURE OF NUCLEIC ACIDS

A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid

WE wish to suggest a structure for the salt of deoxyribose nucleic acid (D.N.A.). This structure has novel features which are of considerable biological interest.

A structure for nucleic acid has already been proposed by Pauling and Corey.¹ They kindly made their manuscript available to us in advance of publication. Their model consists of three intertwined chains, with the phosphates near the fibre axis, and the bases on the outside. In our opinion, this structure is unsatisfactory for two reasons: (1) We believe that the material which gives the X-ray diagrams is the salt, not the free acid. Without the acidic hydrogen atoms it is not clear what forces would hold the structure together, especially as the negatively charged phosphates near the axis will repel each other. (2) Some of the van der Waals distances appear to be too small.

Another three-chain structure has also been suggested by Fraser (in the press). In his model the phosphates are on the outside and the bases on the inside, linked together by hydrogen bonds. This structure as described is rather ill-defined, and for this reason we shall not comment on it.

We wish to put forward a radically different structure for the salt of deoxyribose nucleic acid. This structure has two helical chains each coiled round the same axis (see diagram). We have made the usual chemical assumptions, namely, that each chain consists of phosphate diester groups joining 5'-deoxy-ribose residues with 3',5' linkages. The two chains (but not their bases) are related by a dyad perpendicular to the fibre axis. Both chains follow right-handed helices, but owing to the dyad the sequences of the atoms in the two chains have in opposite directions. Each chain, loosely resembling Furberg's model No. 1,² has the bases on the inside of the helix and the phosphates on the outside. The configuration of the sugar and the atoms near it is close to Furberg's 'standard configuration', the sugar being roughly perpendicular to the attached base. There is a residue on each chain every 3.4 Å. in the z-direction. We have assumed an angle of 30° between adjacent residues in the same chain, so that the structure repeats after 10 residues on each chain, that is, after 34 Å. The distance of a phosphorus atom from the fibre axis is 10 Å. As the phosphates are on the outside, cations have easy access to them.

The structure is an open one, and its water content is rather high. At lower water contents we would expect the bases to tilt so that the structure could become more compact.

The novel feature of the structure is the manner in which the two chains are held together by the purine and pyrimidine bases. The planes of the bases are perpendicular to the fibre axis. They are joined together in pairs, a single base from one chain being hydrogen-bonded to a single base from the other chain, so that the two lie side by side with identical z-coordinates. One of the pair must be a purine and the other a pyrimidine for bonding to occur. The hydrogen bonds are made as follows: purine position 1 to pyrimidine position 1; purine position 6 to pyrimidine position 6.

If it is assumed that the bases only occur in the structure in the most plausible tautomeric forms (that is, with the keto rather than the enol configurations) it is found that only specific pairs of bases can bond together. These pairs are: adenine (purine) with thymine (pyrimidine), and guanine (purine) with cytosine (pyrimidine).

In other words, if an adenine forms one member of a pair, on either chain, then on those assumptions the other member must be thymine; similarly for guanine and cytosine. The sequence of bases on a single chain does not appear to be restricted in any way. However, if only specific pairs of bases can be formed, it follows that if the sequence of bases on one chain is given, then the sequence on the other chain is automatically determined.

It has been found experimentally^{3,4} that the ratio of the amounts of adenine to thymine, and the ratio of guanine to cytosine, are always very close to unity for deoxyribose nucleic acid.

It is probably impossible to build this structure with a ribose sugar in place of the deoxyribose, as the extra oxygen atom would make too close a van der Waals contact.

The previously published X-ray data^{5,6} on deoxyribose nucleic acid are insufficient for a rigorous test of our structure. So far as we can tell, it is roughly compatible with the experimental data, but it must be regarded as unproved until it has been checked against more exact results. Some of these are given in the following communications. We were not aware of the details of the results presented there when we devised our structure, which rests mainly though not entirely on published experimental data and stereochemical arguments.

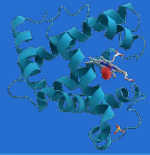
It has not escaped our notice that the specific pairing we have postulated immediately suggests a possible copying mechanism for the genetic material. Full details of the structure, including the conditions assumed in building it, together with a set of co-ordinates for the atoms, will be published elsewhere.

We are much indebted to Dr. Jerry Donohue for constant advice and criticism, especially on inter-atomic distances. We have also been stimulated by a knowledge of the general nature of the unpublished experimental results and ideas of Dr. M. H. F. Wilkins, Dr. R. E. Franklin and their co-workers at

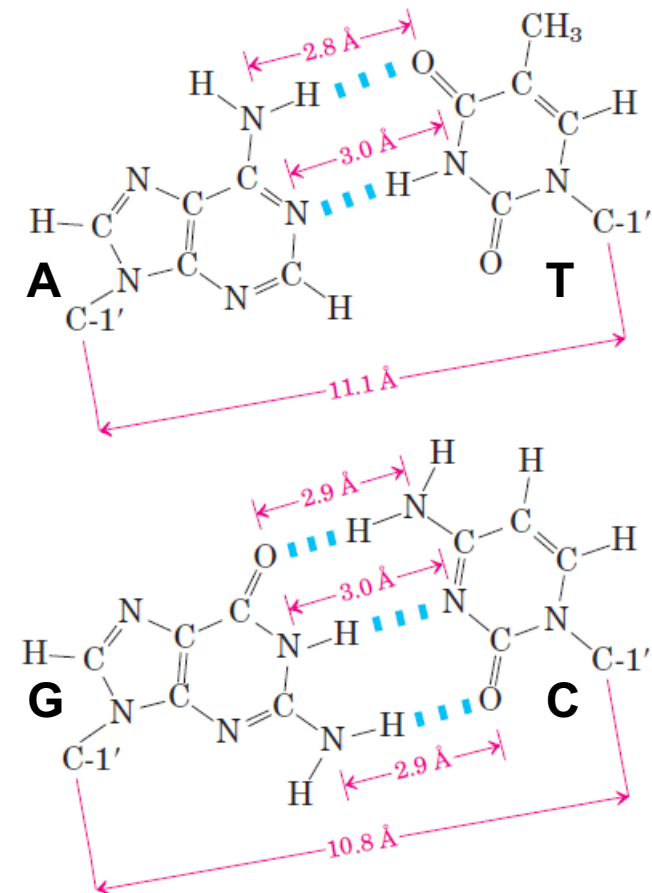
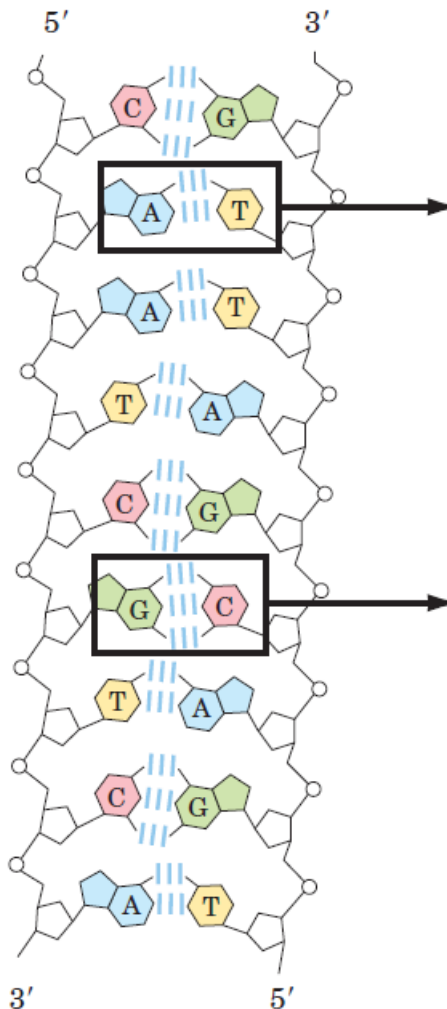


This figure is purely diagrammatic. The two ribbons circumscribe the two phosphate-sugar chains, and the horizontal rungs show the pairs of bases forming the hydrogen bonds. The vertical line marks the fibre axis.

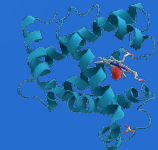
Structura tridimensională a ADN-ului



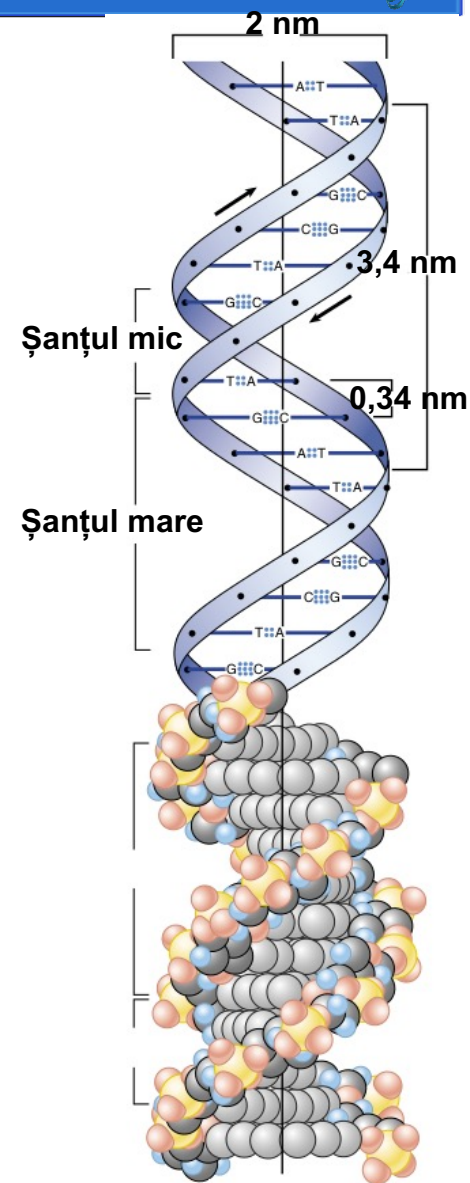
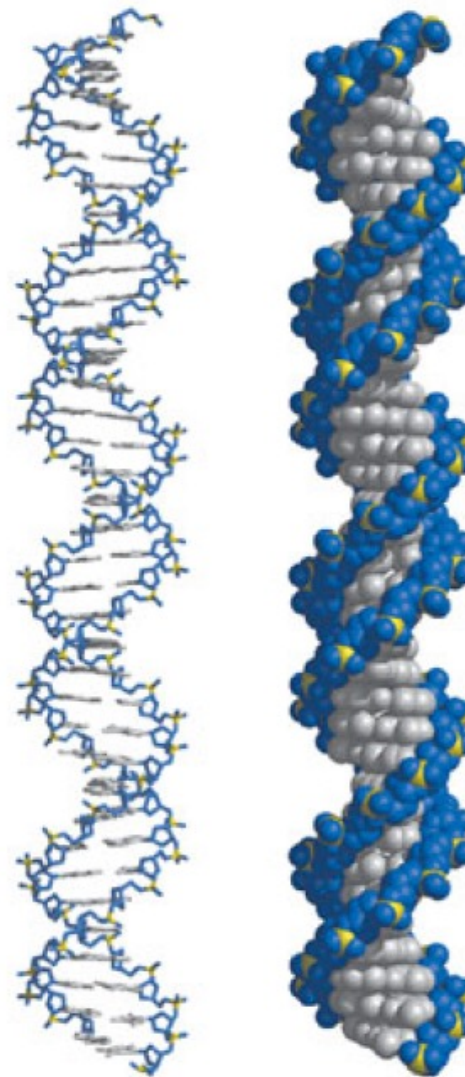
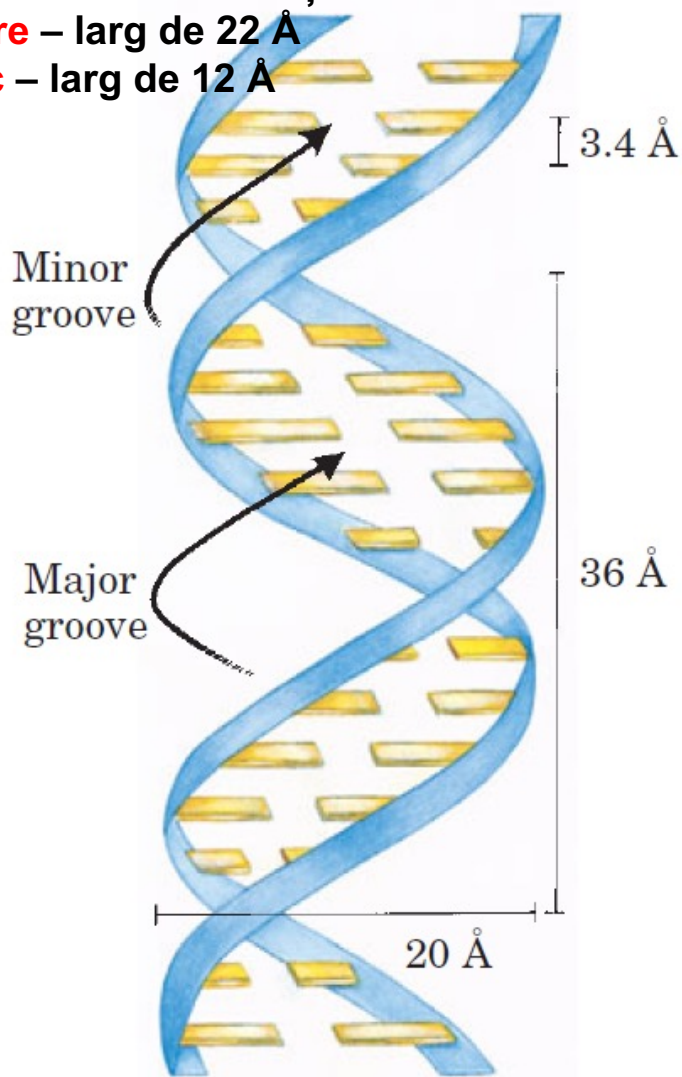
- Scheletul moleculei este reprezentat de catenele cu legături fosfodiesterice ce formează **un dublu helix** spre dreapta. Catenele sunt **antiparalele**, una are orientare $5' \rightarrow 3'$ iar cealaltă $3' \rightarrow 5'$
- Bazele azotate** sunt orientate **spre interior**. Între bazele de pe o catenă și formează legături de hidrogen pe bază de **complementaritate: A-T (2 legături G-C (3 legături))**. O pereche de baze azotate complementare formează un plan perpendicular pe catenă. **Distanța dintre 2 perechi de baze (pb) consecutive** este **de 0.34 nm**.
- Legăturile se formează întotdeauna între o bază purinică și una pirimidinică - dimensiunea unei perechi de baze complementare (pb) și deci diametrul helix-ului dublu este constant – **2 nm**



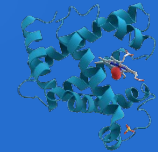
Structura tridimensională a ADN-ului



- O **spiră completă** a dublul helix-ului are **10 pb - 3.4 nm**
- Au fost descrise **două șanțuri**:
 - **șanțul mare** – larg de **22 Å**
 - **șanțul mic** – larg de **12 Å**

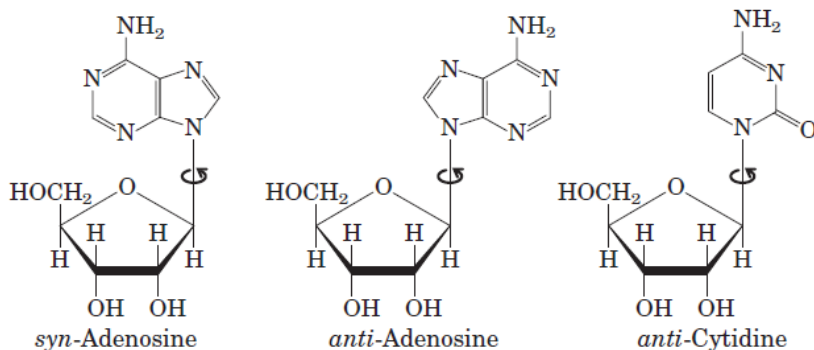


Conformații ale moleculei de ADN

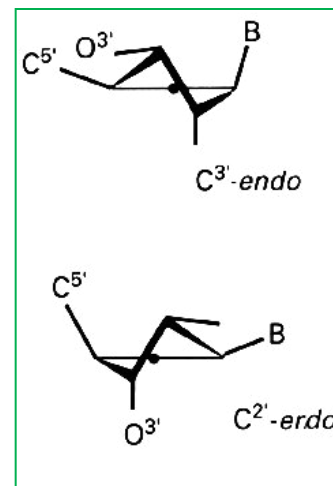
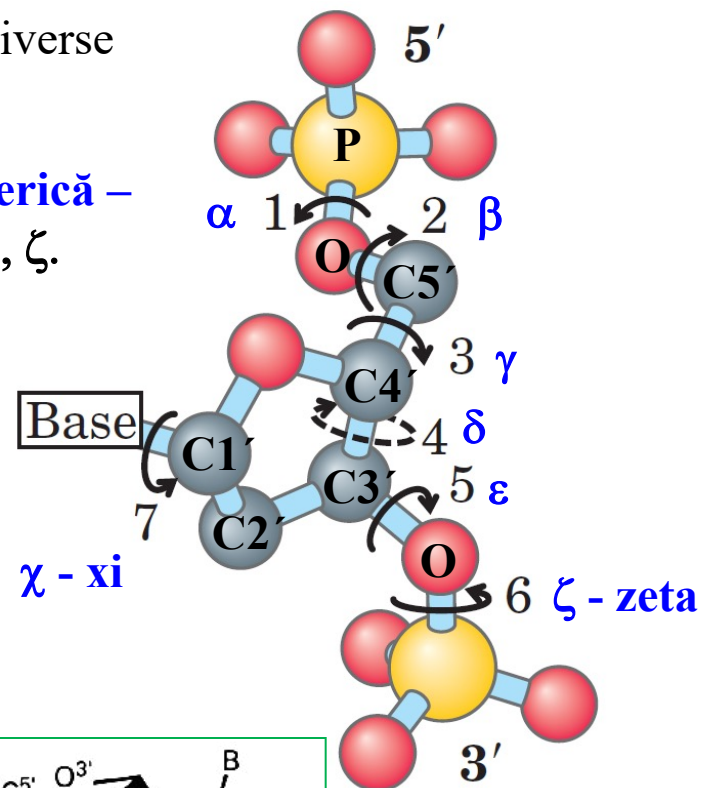


Catena de ADN (și ARN) este deosebit de flexibilă și poate adopta diverse **conformații**. Această flexibilitate rezultă din:

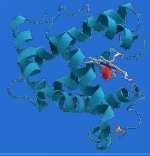
1. **rotația liberă a covalențelor ce alcătuiesc legătura fosfo-diesterică** – au fost descrise 6 unghiuri posibile de rotație, notate: α , β , γ , δ , ϵ , ζ .
2. **rotația liberă a legăturii glicozidice C1' - N** - al 7-lea unghi de rotație, notat χ . O serie de constrângeri sterice fac ca acest unghi să ia valori limitate, în raport cu glucidul bazei azotate putând avea 2 orientări distincte: **syn** și **anti** (pentru purine doar **anti**)



3. **conformațiile posibile ale restului glucidic -**



Conformații ale moleculei de ADN



Funcție de valorile pe care le iau cele 7 unghiuri și conformația restului de deoxiriboză au fost descrise 3 forme majoritare diferite ale moleculei de ADN:

1. Conformația sau forma B (ADN-ul B) – este structura descrisă de Watson-Crick, forma în care ADN-ul este cel mai stabil în condiții fiziologice, o spiră completă este alcătuită din **10,5 baze**;

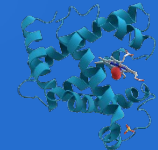
2. Conformația sau forma A (ADN-ul A) - forma în care ADN-ul este cel mai stabil în medii ne-apoase; helix-ul este mai larg, bazele nu sunt perpendiculare pe catene ceea ce face ca sanțul mare să fie mai adânc, o spiră completă conține **11 baze** ;

3. Conformația sau forma Z (ADN-ul Z) – helix-ule este spre stânga, o spiră completă conține **12 baze**.

	A form	B form	Z form
Helical sense	Right handed	Right handed	Left handed
Diameter	~26 Å	~20 Å	~18 Å
Base pairs per helical turn	11	10.5	12
Helix rise per base pair	2.6 Å	3.4 Å	3.7 Å
Base tilt normal to the helix axis	20°	6°	7°
Sugar pucker conformation	C-3' endo	C-2' endo	C-2' endo for pyrimidines; C-3' endo for purines
Glycosyl bond conformation	Anti	Anti	Anti for pyrimidines; syn for purines



Stabilirea structurii primare a ADN-ului



Secvențierea ADN-ului - procesul de identificare a ordinii precise a nucleotidelor (ATCG) într-o moleculă de ADN – structura primara a ADN-ului.

În prezent există numeroase metode de secvențializare a ADN-ului clasificate în:

- metode derivate de la **metoda chimică** a lui **Maxam și Gilbert**;
- metode derivate de la **metoda enzimatică** a lui **Sanger**;
- **metode de "nouă generație (next-gen)"** sau mai corect **metode de secvențiere în masă (high throughput)** – **pirosecvențiere, ion-torrent, etc.**

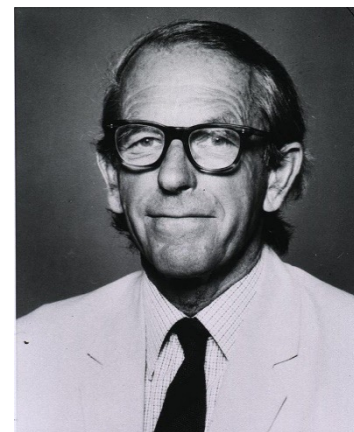
Metoda enzimatică Sanger

- una din primele metode de secvențializare a fost descrisă în 1977 de Frederick Sanger care a primit cel de-al doilea premiu Nobel pentru descoperirea sa;

- se bazează tot pe reacția de replicare a ADN-ului catalizată de o **polimerază ADN-dependentă**;

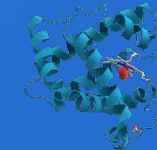
Elementele esențiale realizării unei reacții de secvențiere prin metoda Sanger

- a) **fragment ADN de secvențiat** – o moleculă de ADN monocatenară;
- b) **polimeraza ADN**;
- c) cele **4 deoxinucleotide** obișnuite (dNTP: A, T, C, G);
- c) o **oligonucleotide amorsă** (primer) complementare cu molecula de secvențiat marcată radioactiv și care oferă un capăt 3' liber;
- d) **4 di-deoxinucleotide** (ddNTPs: ddA, ddC, ddG, ddT) – nucleotide ce nu au gruparea hidroxil în pozițiile **2' (deoxi)** și **3' (di)**.

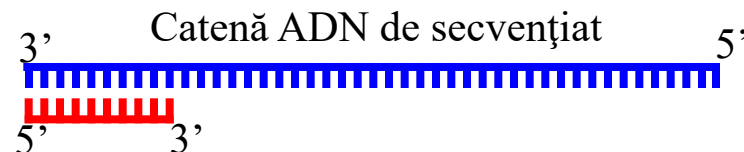


Frederick Sanger - 13 August 1918 – 19 November 2013

Etapele reacției de secvențializare ADN prin metoda Sanger



1) Legarea oligonucleotidului primer



Oligonucleotidă primer marcată radioactiv

2) **Elongarea** primerului prin acțiunea ADN polimerazei în prezența dNTP și ddNTP cu sinteza unei catene noi. Reacția se realizează în 4 eprubete diferite, fiecare conținând un singur tip de ddNTP (ddATP, ddGTP, ddCTP sau ddTTP). **Încorporarea unui ddNTP în noua catenă face ca sinteza acesteia să se oprească (ddNTP sunt "terminatori" de catenă).** Încorporarea unui ddNTP de către ADN-polimeraza este un proces statistic ceea ce face ca prin elongare să se genereze în fiecare eprubetă câte o colecție de catene ADN nou sintetizate de dimensiuni diferite.



#ddA

#AGCTGCCCCG



#AGddC

#AGCTGddC

#AGCTGCddC

#AGCTGCCddC

#AGCTGCCCCG

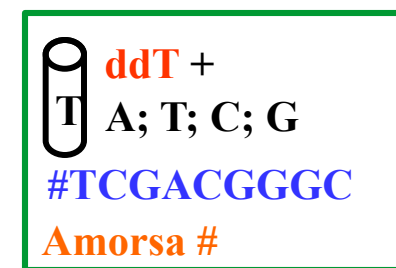


#AddG

#AGCTddG

#AGCTGCCCCddG

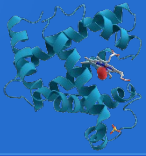
#AGCTGCCCCG



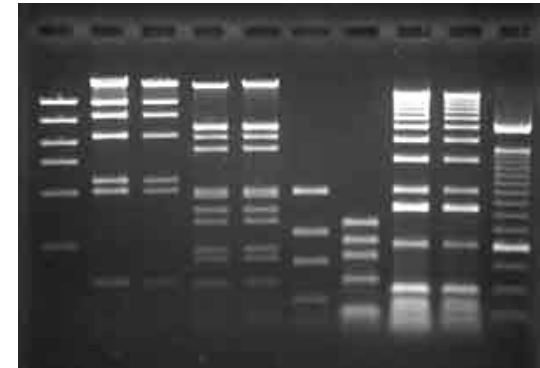
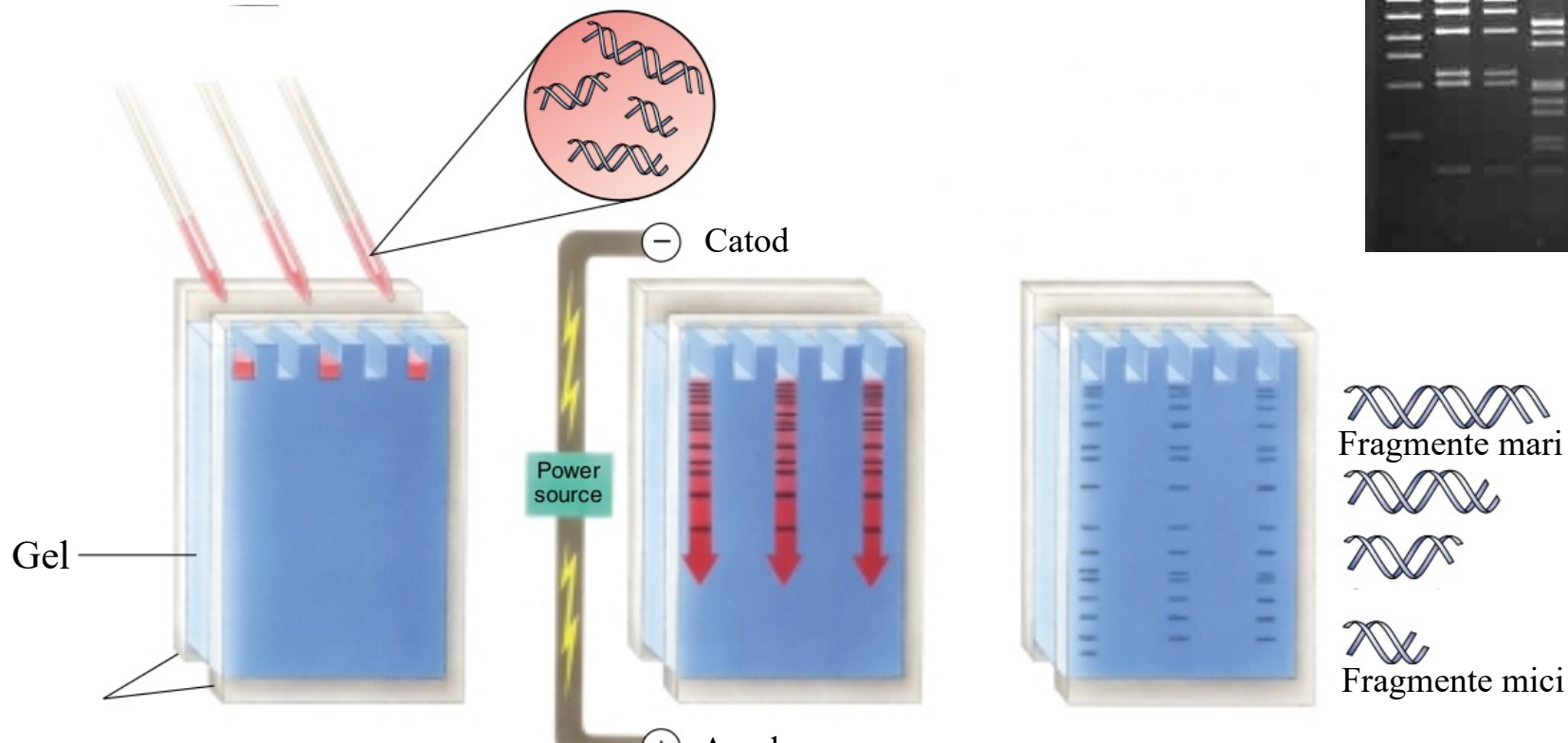
#AGCddT

#AGCTGCCCCG

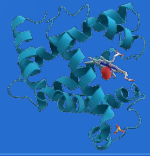
Etapele reacției de secvențiere ADN prin metoda Sanger



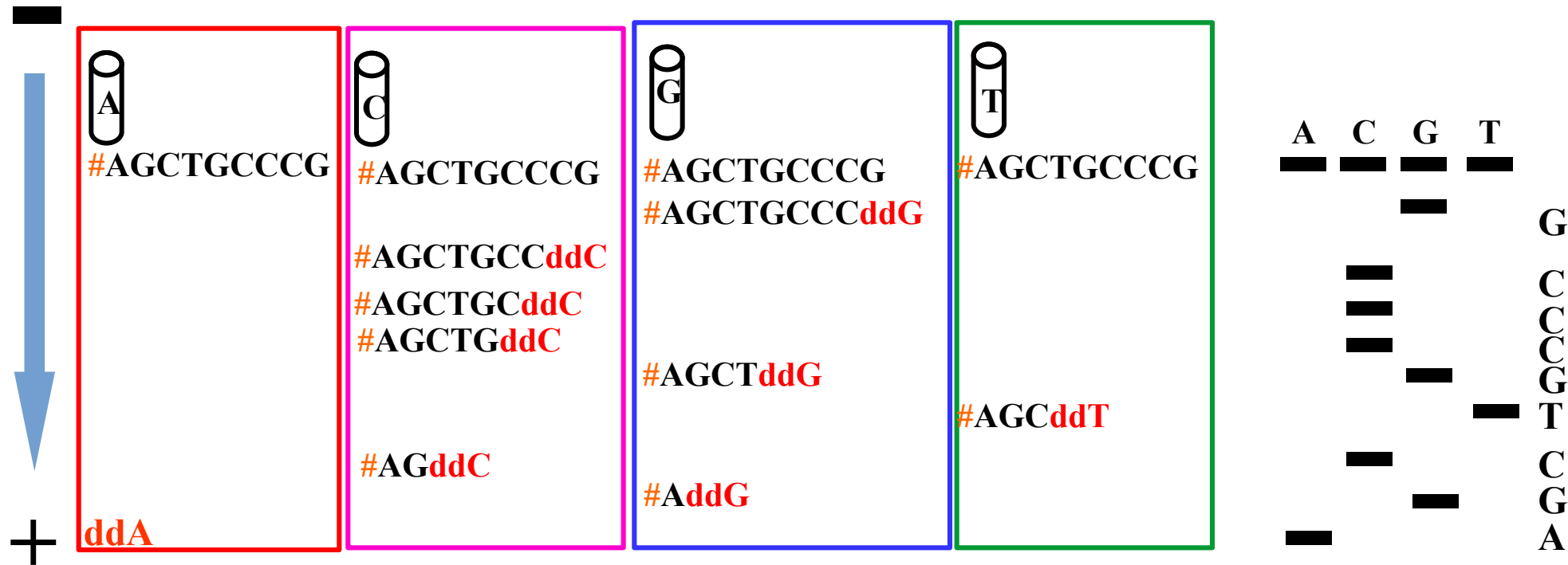
3) Separarea catenelor nou sintetizate funcție de dimensiune – se realizează prin **electroforeză** – moleculele de ADN sunt încărcate negativ și la aplicarea unui curent vor migra spre polul pozitiv. Electroforeza se realizează în geluri de poliacrilamidă ce acționează ca o sită, frânând moleculele mari, astfel încât moleculele mici vor migra mai mult iar cele mari mai puțin.



Etapele reacției de secvențiere ADN prin metoda Sanger

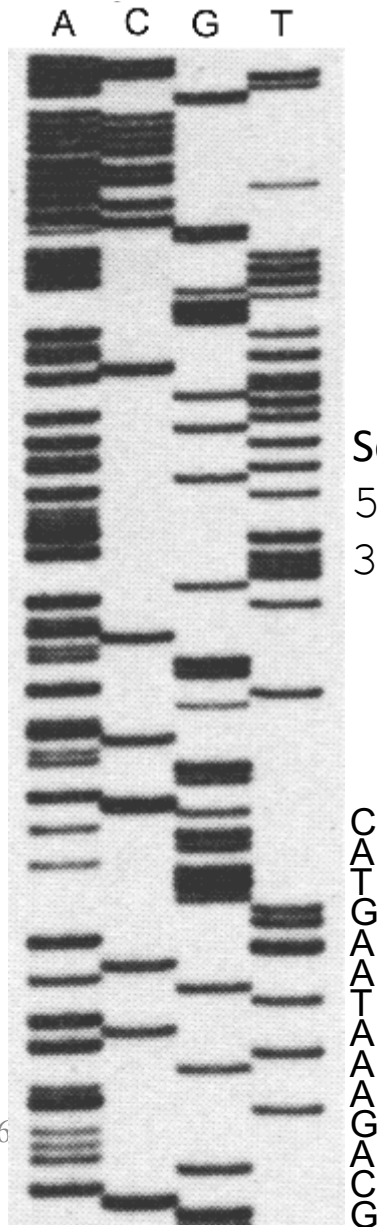
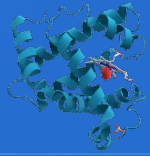


4) Vizualizarea catenelor nou sintetizate – se realizează prin **autoradiografie** – pe baza marcajului radioactiv al oligonucleotidului amorsă.



Schema autoradiografiei unui gel de secvențializare

Secvențierea ADN-ului

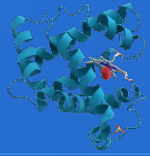


Care este secvența fragmentului de ADN prin a cărui secvențiere Sanger se obține gelul de alături?

Secvența citită de pe gel:

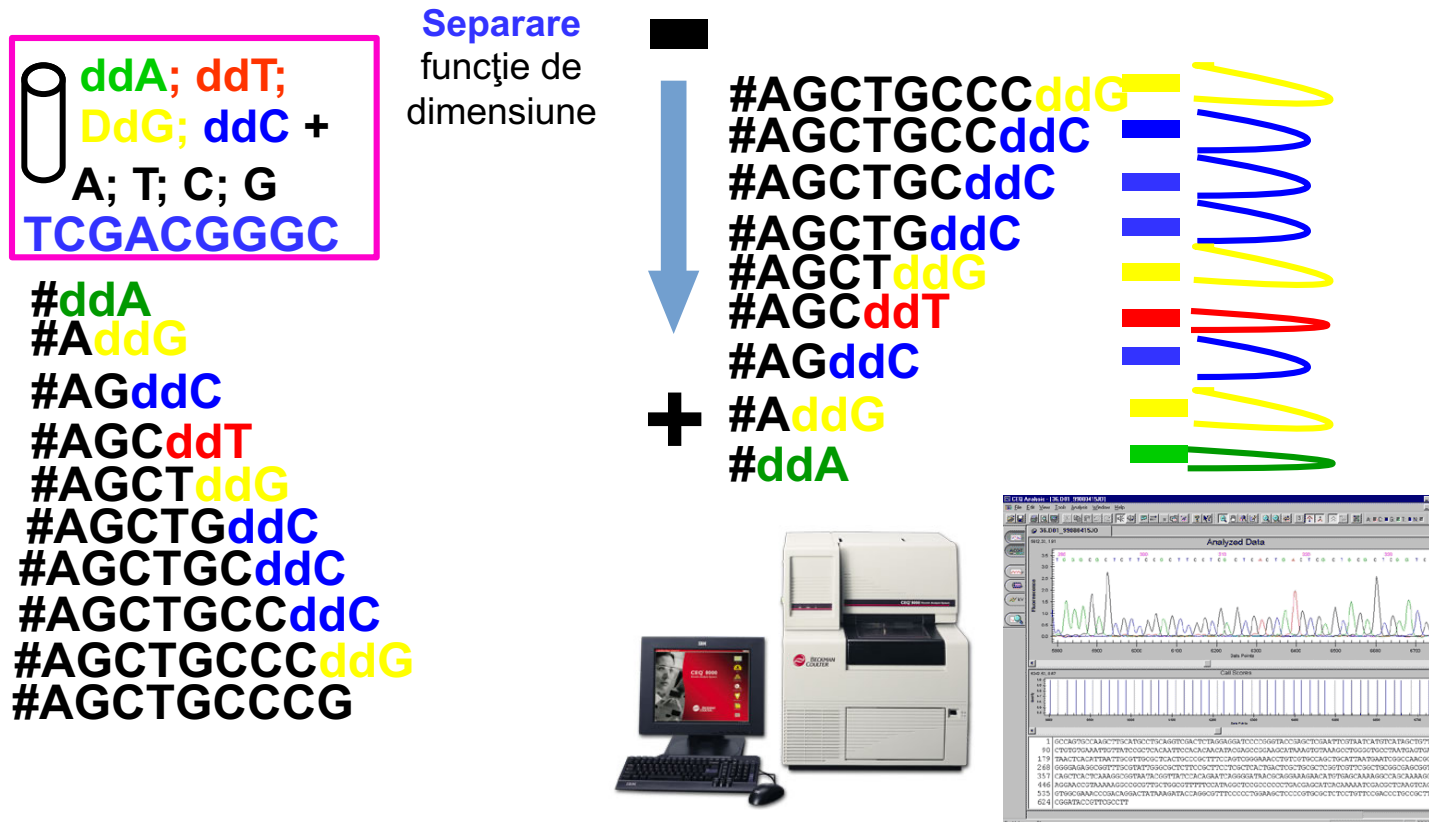
5' –GCAGAAATAAGTAC–3' deci secvența catenei de secvențiat era:
3' –CGTCTTTATTCATG–3'

Secvențierea ADN-ului

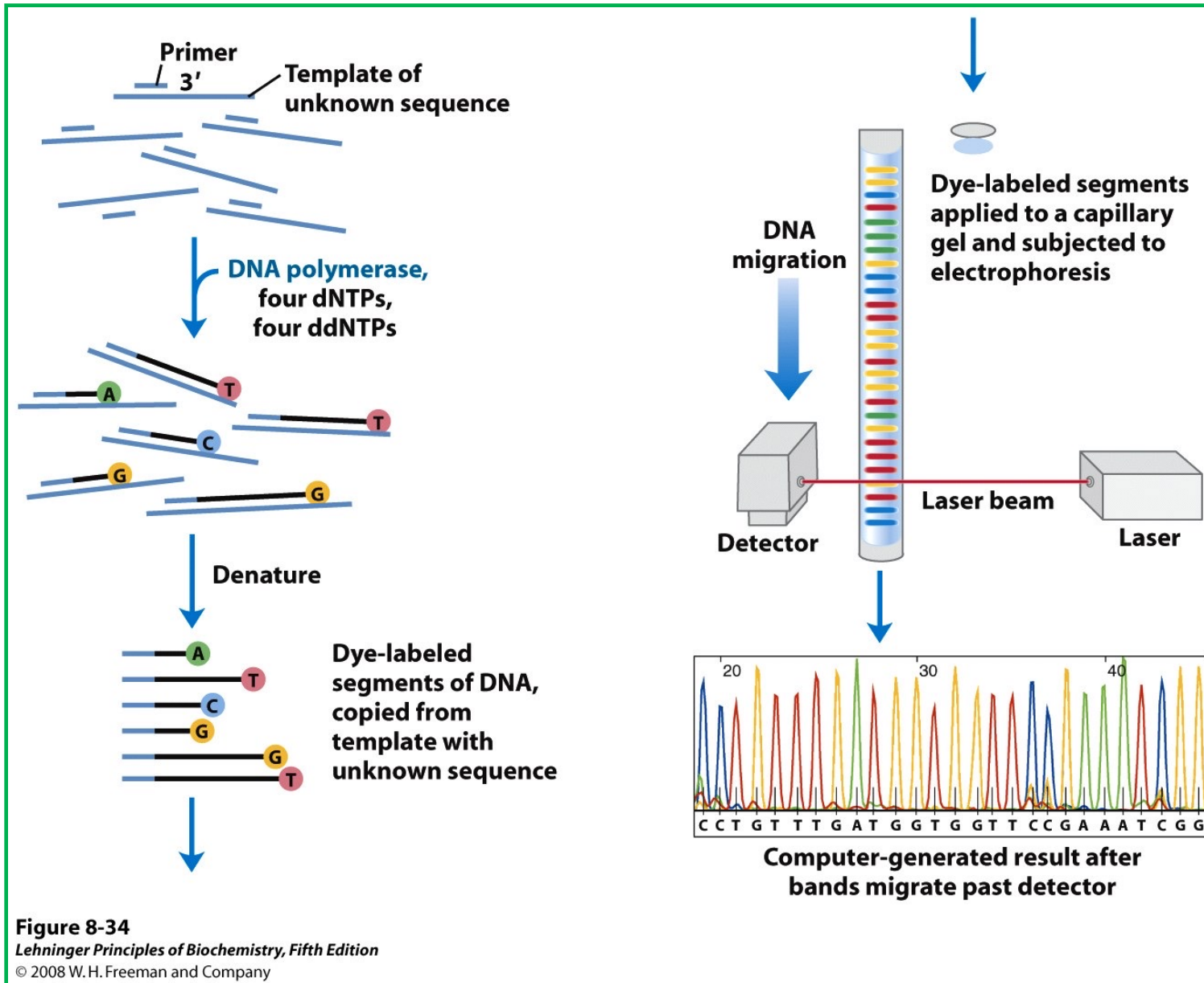
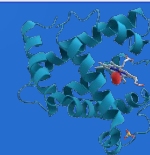


O variantă a metodei Sanger este:

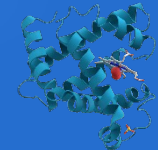
- **utilizarea de "terminatori" de catenă marcați fluorescenți.** Fiecare din cele 4 ddNTP sunt marcate cu câte un fluorocrom diferit (ddA – verde, ddT – roșu, ddG – galben, ddC – albastru). Reacția se desfășoară într-o singură eprubetă, iar fragmentele generate sunt separate prin electroforeză. Ordinea nucleotidelor este citită cu ajutorul unui laser și reprezentată ca "peak-uri".



Secvențierea ADN-ului



Metode de secvențiere “de nouă generație”

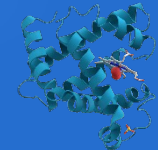


Nevoia de a secvenția cantități mari de ADN (**genomul uman - 6.27 Gpb, un genom bacterian 4-5 Mpb**) rapid și cu costuri reduse a dus la apariția unor noi metode de secvențiere, ce funcționează după principii diferite de metoda Sanger. Aceste metode au fost numite general **next generation sequencing / Nextgen / metode NGS / metode de nouă generație**. Primele metode Nextgen au apărut în anii 80. De atunci s-au dezvoltat succesiv două generații de metode de secvențiere și este de așteptat ca noi metode să fie dezvoltate în viitor. De aceea termenul **Nextgen** a devenit ambiguu și se preferă înlocuirea sa cu:

1. Metode de secvenție de generația a II / secvențiere masivă paralelă / metode de secvențiere a fragmentelor mici: **secvențierea prin hibridizare** și **secvențierea prin sinteză** (SBS – **sequencing by synthesis**)
2. Metode de secvenție de generația a III / metode de secvențiere a fragmentelor lungi: **SMRT** (Single Molecule Real Time) și secvențiere folosind nanopori proteici **Oxford Nanopore Technologies**

Toate aceste metode permit generarea unui număr semnificativ mai mare de nucleotide secvențiate comparativ cu metoda Sanger, de aceea ele mai sunt denumite și metode **metode extensive** (**High-throughput**)

Metode de secvenție de generația a II

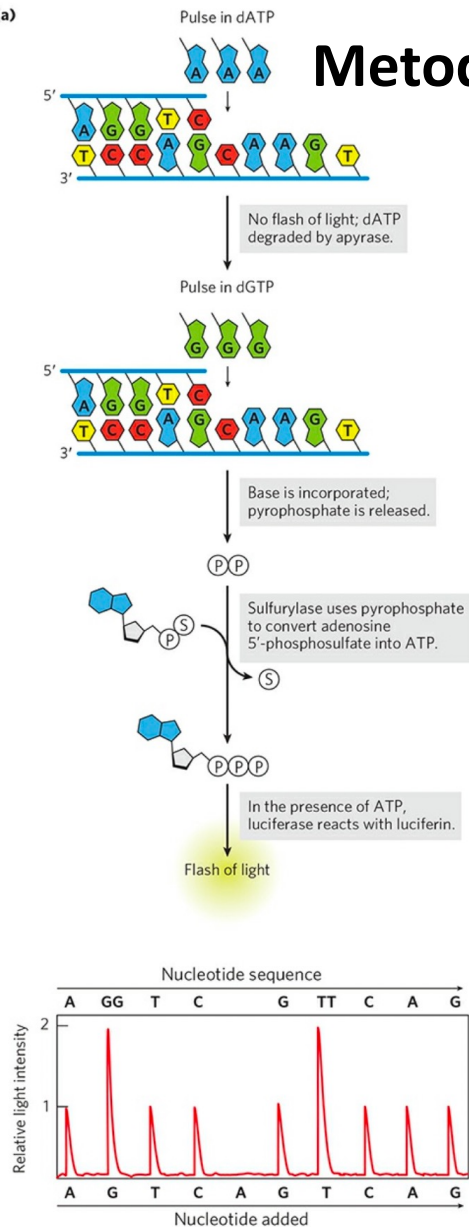


Secvențierea prin hibridizare - a fost dezvoltată în anii 80 și si-a găsit aplicații mai ales în diagnostic, însă impactul acestei tehnologii în prezent este redus

Secvențierea prin sinteză - SBS – moleculele de ADN sunt fragmentate enzimatic sau mecanic în bucăți cu lungimea de câteva sute de nucleotide. Aceste fragmente sunt apoi imobilizate pe suporturi solide și fiecare fragment este amplificat individual prin PCR pentru a forma grupe (cluster) de secvențe identice, copii ale fragmentului de ADN matriță. Suprafața solidă este parte a unui canal prin care circulă reactivii necesari procesului de secvențiere. Pe suprafața solidă de câțiva cm lățime sunt atașate astfel milioane de cluster de fragmente de ADN, fiecare cluster conținând copii ale aceleiași molecule. Clusterelor vor fi secvențiate simultan, fiecare cluster generând date de secvență ale fragmentului original. Funcție de modul cum se detectează secvența din aceste cluster, tehnologiile SBS se clasifică în:

A. Pirosecvențiere sau secvențierea **454** - soluții cu câte una din cele 4 dNTP spală suprafața solidă pe care sunt fixate clusterelor de fragmente alternativ. Soluția cu un dNTP stă în contact cu suprafața solidă suficient cât aceasta să fie incorporată încatene de ADN complementare cu cele din cluster de către o ADN polimerază. Excesul de nucleotide este apoi distrus de o apirază înainte de a veni pulsul cu următoare nucleotidă. Dacă o nucleotidă este încorporată în unul din clusteri, încorporarea sa va fi însoțită de eliberarea unui rest de pirofosfat. Enzima sulfurilaza folosește acest pirofosfat pentru a transforma adenozone 5'- fosfosulfatul din mediu în ATP, iar ATP-ul este utilizat de enzima luciferază pentru a produce lumină. Adăția unei nucleotide în unul din cluster va fi deci însoțită de eliberarea de lumină. Cunoșcând ce dNTP scâlde suprafața solidă la momentul eliberării de lumină, se identifică ce nucleotidă a fost încorporată.

(a)

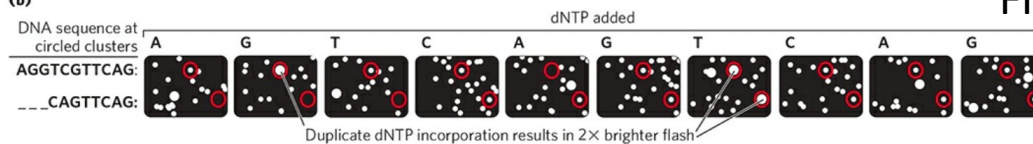


„.....when dCTP is added to the solution, flashes occur only at clusters where G is the next base in the template and C is the next nucleotide to be added to the growing DNA chain. If there is a string of two, three, or four G residues in the template, a similar number of C residues are added to the growing strand in one cycle. This is recorded as a “flash” amplitude at that cluster that is two, three, or four times greater than when only one C residue is added. Similarly, when dGTP is added, flashes occur at a different set of clusters, marking those as clusters where G is the next nucleotide added to the sequence (where C is present in the template). The length of DNA that can be reliably sequenced in a single cluster by this method—often referred to as the read length, or “read”—is typically 400 to 500 nucleotides, and is rapidly increasing.”

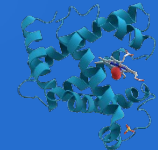
Lehniger 7th edition, pg 307

FIGURE 8-36 pg 307, Lehniger 7th edition

(b)



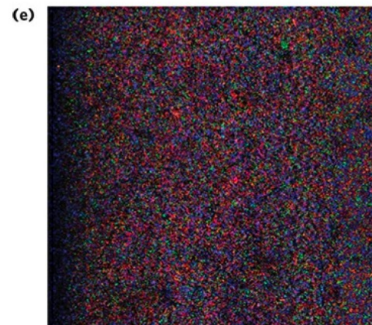
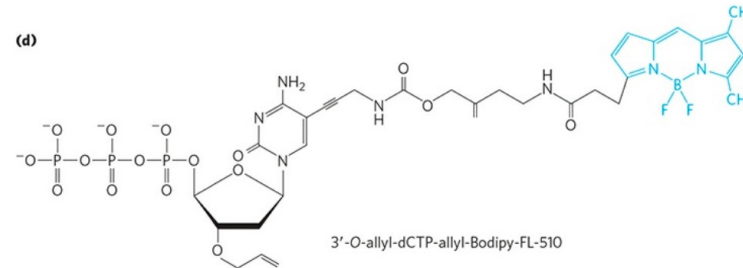
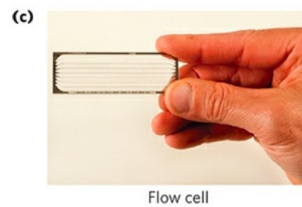
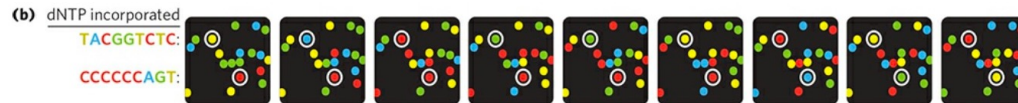
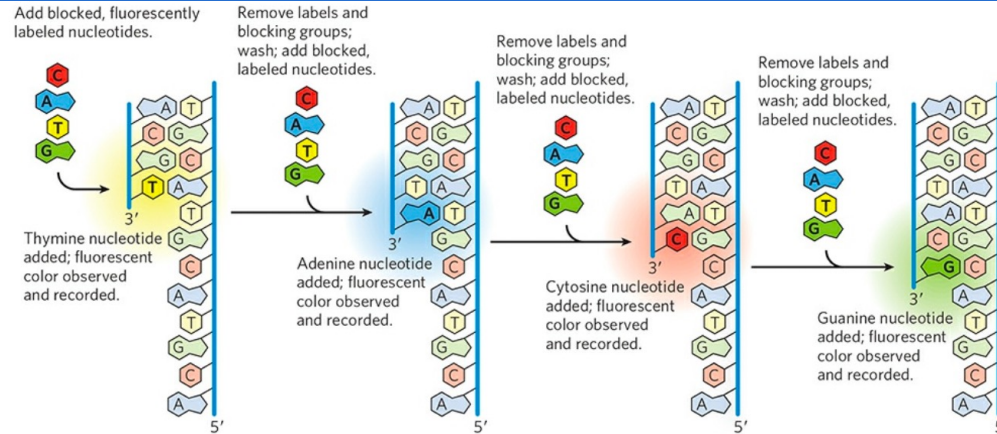
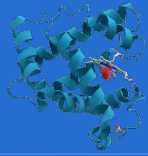
Metode de secvenție de generația a II



B. Tehnologia Ion Torrent - tehnologia are la bază faptul că în replicare a ADN-ului, adădăa unei nucleotide pe catena nascentă este însoțită de eliberarea unui proton, ceea ce duce la o modificare a pH-ului soluției în care se produce sinteza. Această modificare de pH poate fi înregistrată și corelată cu nucleotida atașată. Fragmentele de ADN de secvențiat sunt atașate pe bile de dimensiuni mici și sunt amplificate pentru a genera mii de copii ale aceleiași molecule, fiecare bilă având un set de copii ale aceleiași molecule de ADN de câteva sute de nucleotide. Fiecare bilă este amplasată într-un godeu și spălată succesiv cu soluții ce conțin câte una din cele 4 dNTP. Dacă la o spălare se încorporează o nucleotidă, se va înregistra o modificare de pH în godeul corespunzător. Dacă nucleotida din soluția de spălare nu se încorporează, nu se ca modifica pH-ul și concluzia este că fragmentul nascent nu conține acea nucleotidă.

C. Tehnologia Illumina sau secvențierea cu terminatori reversibili – tehnologia se bazează pe un set de cele 4 deoxinucleotide modificate: fiecare nucleotidă (A,T, G, C) conține un marker fluorescent specific (fluorofor) și la capătul 3' un terminator de sinteză detașabil. Amestecul de 4 nucleotide scaldă suportul solid conținând milioane de clustere de fragmente identice iar polimeraza încorporează nucleotidele marcate cu terminatorul atașat. În fiecare cluster se atașează o nucleotidă specifică, complementară cu catena matriță. Un laser excită fiecare cluster care emite lumină de culoare diferită, funcție de nucleotida ce a fost încorporată. Marcherii fluorescenți și terminatorii de sinteză din poziția 3' sunt apoi eliminați printr-o reacție chimică și se adaugă din nou amestecul de nucleotide peste clustere, ceea ce duce la atașarea unei noi nucleotide și emiterea de lumină funcție de nucleotida atașată.

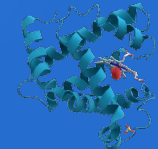
Metode de secvenție de generația a II



Lehninger 7th edition, pg 308

FIGURE 8-37 Next-generation reversible terminator sequencing. (a) The

Metode de secvenție de generația a III



Spre deosebire de metodele de generația a II, cele de generația III își propun să secvențieze moleculele de acizi nucleici fără a le mai fragmenta și fără a genera clusteri de secvențe identice. Momentan, 2 tehnologii distincte reușesc să secvențieze fragmente de ADN mai lungi de 30-50 de kpb:

A. Tehnologia SMRT - Singe Molecule Real Time – o moleculă de ADN de secvențiat este atașată împreună cu o ADN-polimerază de fundul unui godeu de dimensiuni foarte mici ce poartă numele de ZMW (**zero-mode waveguide**). Prin dimensiuni și formă, această cameră ghidează lumina spre o zonă foarte redusă spre fundul godeului. Peste ADN-polimerază și ADN-ul de secvențiat se adaugă o soluție cu cele 4 nucleotide de care sunt atașate prin legături fosforice fluorofori. ADN-polimeraza începe sinteza unei noi catene și încorporează un nucleotid și pe fundul ZMW se formează o imagine corespunzător culorii emise de fluorofor. Prin încorporare, fluoroforul este eliberat și difuzează spre partea superioară a ZMW, ceea ce face ca semnalul luminos să dispară. O nouă nucleotidă este atașată pe fundul ZMW pe bază de complementaritate și apare deci o nouă culoare corespunzătoare fluoroforului atasat de acea nucleotidă.

Real-Time DNA Sequencing from Single Polymerase Molecules

John Eid,* Adrian Fehr,* Jeremy Gray,* Khai Luong,* John Lyle,* Geoff Otto,* Paul Peluso,* David Rank,* Primo Baybayan, Brad Bettman, Arkadiusz Bibillo, Keith Bjornson, Bidhan Chaudhuri, Frederik Christians, Ronald Ciero, Sonya Clark, Ravindra Dalal, Alex deWinter, John Dixon, Mathieu Foquet, Alfred Gaertner, Paul Hardenbol, Cheryl Heiner, Kevin Hester, David Holden, Gregory Kearns, Xiangxu Kong, Ronald Kuse, Yves Lacroix, Steven Lin, Paul Lundquist, Congcong Ma, Patrick Marks, Mark Maxham, Devon Murphy, Insil Park, Thang Pham, Michael Phillips, Joy Roy, Robert Sebra, Gene Shen, Jon Sorenson, Austin Tomany, Kevin Travers, Mark Trulson, John Vioceci, Jeffrey Wegener, Dawn Wu, Alicia Yang, Denis Zaccarin, Peter Zhao, Frank Zhong, Jonas Kurlach,† Stephen Turner†

We present single-molecule, real-time sequencing data obtained from a DNA polymerase performing uninterrupted template-directed synthesis using four distinguishable fluorescently labeled deoxyribonucleoside triphosphates (dNTPs). We detected the temporal order of their enzymatic incorporation into a growing DNA strand with zero-mode waveguide nanostructure arrays, which provide optical observation volume confinement and enable parallel, simultaneous detection of thousands of single-molecule sequencing reactions. Conjugation of fluorophores to the terminal phosphate moiety of the dNTPs allows continuous observation of DNA synthesis over thousands of bases without steric hindrance. The data report directly on polymerase dynamics, revealing distinct polymerization states and pause sites corresponding to DNA secondary structure. Sequence data were aligned with the known reference sequence to assay biophysical parameters of polymerization for each template position. Consensus sequences were generated from the single-molecule reads at 15-fold coverage, showing a median accuracy of 99.3%, with no systematic error beyond fluorophore-dependent error rates.

The Sanger method for DNA sequencing (1) uses DNA polymerase to incorporate the 3'-deoxyribonucleoside that terminates the synthesis of a DNA copy. This method relies

Pacific Biosciences, 1505 Adams Drive, Menlo Park, CA 94025, USA.

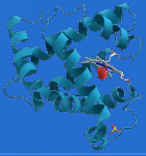
*These authors contributed equally to this work.
†To whom correspondence should be addressed. E-mail: jkurlach@pacificbiosciences.com (J.K.); sturner@pacificbiosciences.com (S.T.)

on the low error rate of DNA polymerases, but exploits neither their potential for high catalytic rates nor high processivity (2–4). Increasing the speed and length of individual sequencing reads beyond the current Sanger technology limit will shorten cycle times, accelerate sequence assembly, reduce cost, enable accurate sequencing analysis of repeat-rich areas of the genome, and reveal large-scale genomic complexity (5, 6). Alternative approaches that increase sequencing performance

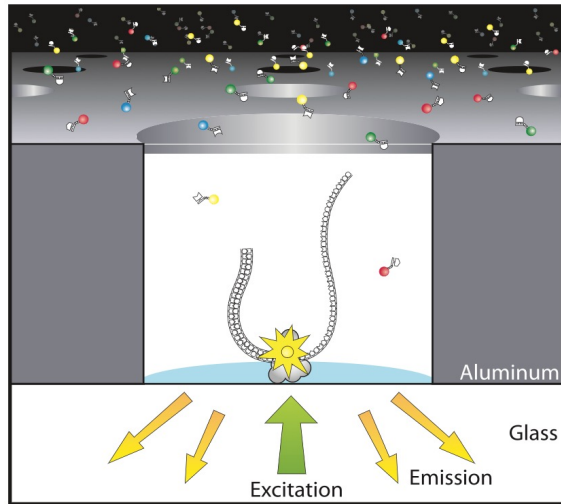
have been reported [(7–10), reviewed in (11, 12)]. Several of these methods have been deployed as commercial sequencing systems (13–16), which have greatly increased overall throughput, enabling many applications that were previously unfeasible. However, because these methods all gate enzymatic activity, using various termination approaches, they have not yielded longer sequence reads (limited to ~400 nucleotides), nor do they exploit the high intrinsic rates of polymerase-catalyzed DNA synthesis.

The use of DNA polymerase as a real-time sequencing engine—that is, direct observation of processive DNA polymerization with base-pair resolution—has long been proposed but has been difficult to realize (7, 8, 17–22). To fully harness the intrinsic speed, fidelity, and processivity of these enzymes, several technical challenges must be met simultaneously. First, the speed at which each polymerase synthesizes DNA exhibits stochastic fluctuation, so polymerase molecules would need to be observed individually while they undergo template-directed synthesis. Because of the high nucleotide concentrations required by DNA polymerases (20), a reduction in the observation volume beyond what is afforded by conventional methods, such as confocal or total internal reflection microscopy, directly improves single-molecule detection. Second, deoxyribonucleoside triphosphate (dNTP) substrates must carry detection labels that do not inhibit DNA polymerization even when 100% of the native nucleotides are replaced with their labeled counterparts. Third, a surface chemistry is required that retains activity of DNA polymerase molecules and inhibits nonspecific adsorption of labeled dNTPs. Finally, an instrument is required that can faithfully detect and distinguish incorporation of four different labeled dNTPs. Here, we provide proof-of-concept for an approach to highly

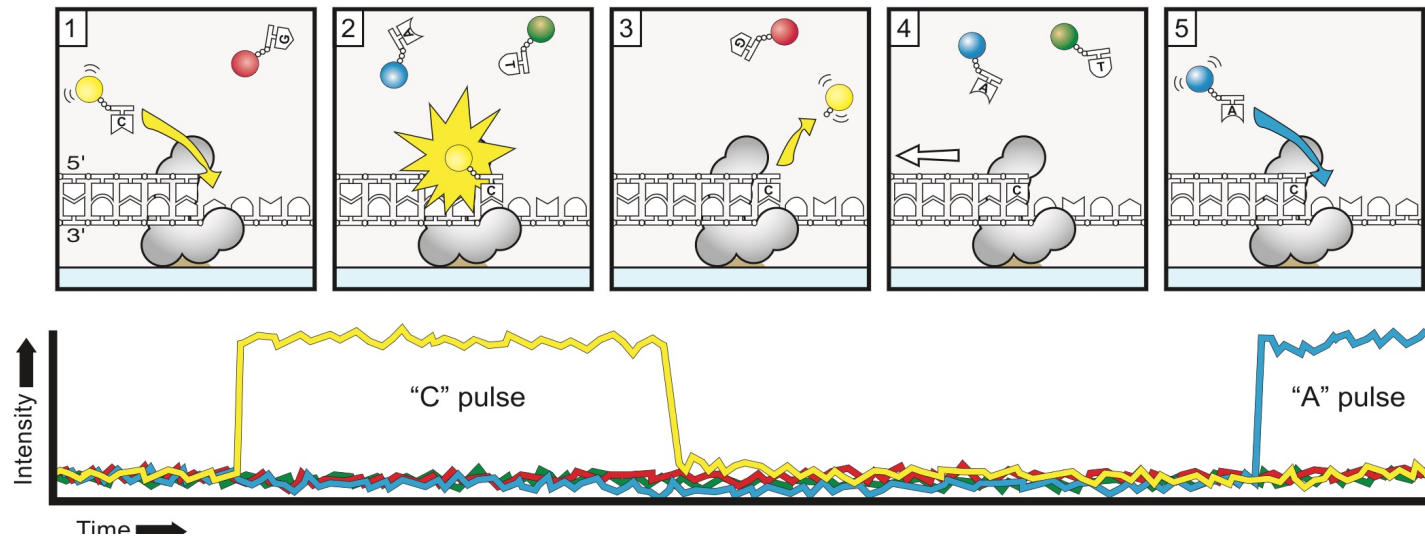
Metode de secvenție de generația a III



A

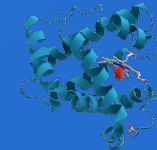


B

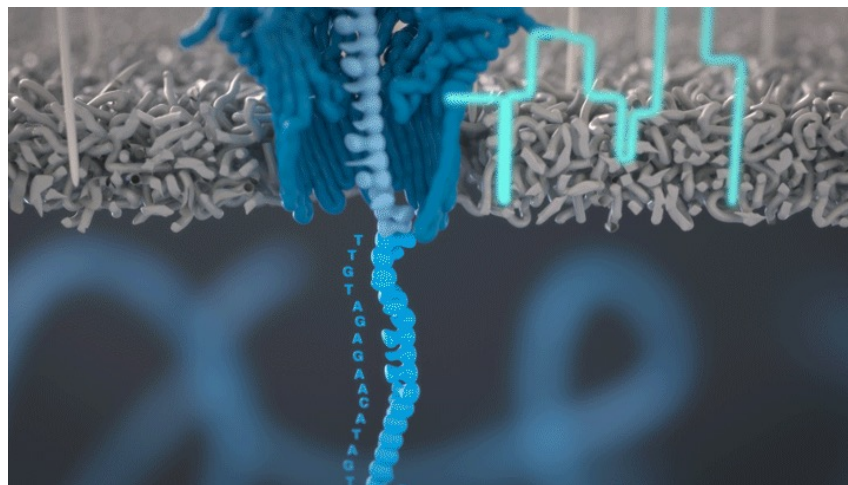
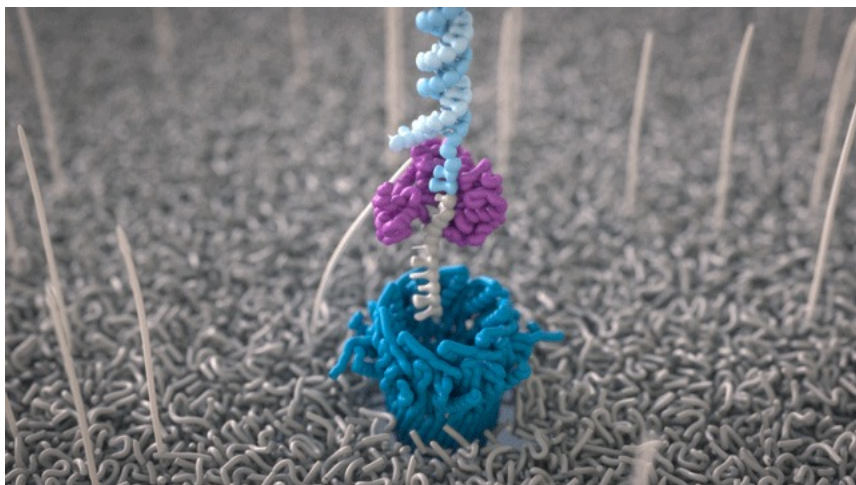


[DOI: 10.1126/science.1162986](https://doi.org/10.1126/science.1162986)

Metode de secvenție de generația a III



B. secvențiere folosind nanopori proteici – folosește proteine transmembranare ce pot fi traversate de molecule de acizi nucleici precum alfa-hemolisină și porina A din *Mycobacterium smegmatis* (MspA). Moleculele de ADN trec prin por cu o viteză de constantă controlată de ADN polimerază phi29 și duc la modificarea diametrului interior al porului. Modificările sunt dependente de forma nucleotidei ce trece și sunt înregistrate sub forma unor curenți transmembranari. Funcție de caracteristicile curentului generat de trecerea unei molecule de ADN, se poate detecta secvența acesteia.



<https://nanoporetech.com/how-it-works>