

Seqüenciamento

Embrapa

Biologia Computacional 1000000
Universidade Federal de Viçosa, 36526-900

1977: Walter Gilbert e Frederick Sanger seqüenciamento de DNA

Nobel 1980
“pelas contribuições na determinação de seqüências de ácidos nucleicos”

Embrapa

Poliana R. da Silva
Biologia Computacional 1000000
Universidade Federal de Viçosa, 36526-900

Proc. Natl. Acad. Sci. USA
Vol. 74, No. 12, pp. 5463-5467, December 1977
Biochemistry

DNA sequencing with chain-terminating inhibitors

(DNA polymerase/nucleotide sequences/bacteriophage ϕ X174)

F. SANGER, S. NICKLEN, AND A. R. COULSON

Medical Research Council Laboratory of Molecular Biology, Cambridge CB2 2QH, England

Contributed by F. Sanger, October 3, 1977

Embrapa

Poliana R. da Silva
Biologia Computacional 1000000
Universidade Federal de Viçosa, 36526-900

Procedimento enzimático

(Sanger, 1977)

A posição das bases é determinada pelo tamanho dos fragmentos obtidos através de reações de **polimerização** na presença de **dideoxinnucleotídeos**.

Embrapa

Poliana R. da Silva
Biologia Computacional 1000000
Universidade Federal de Viçosa, 36526-900

Polimerização de DNA

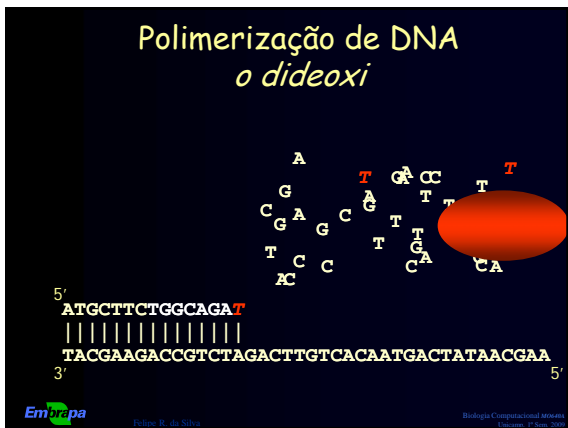
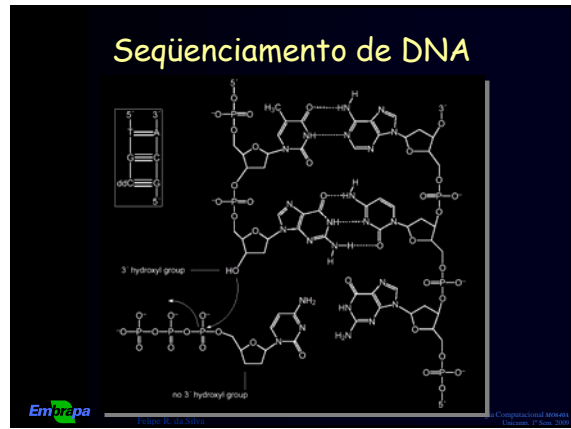
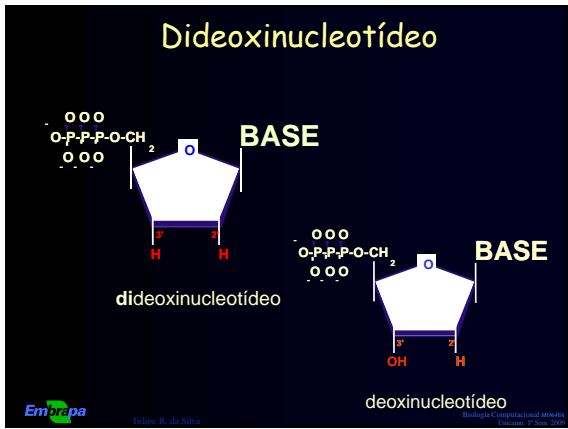
Embrapa

Poliana R. da Silva
Biologia Computacional 1000000
Universidade Federal de Viçosa, 36526-900

Polimerização de DNA

Embrapa

Poliana R. da Silva
Biologia Computacional 1000000
Universidade Federal de Viçosa, 36526-900



Seqüenciamento de DNA

- molde
- polimerase
- dNTPs

•ddGTPs

•ddATPs

•ddTTPs

•ddCTPs

Embrapa | Felipe R. da Silva | Biologia Computacional: Métodos | Volume 1 | São Carlos, 2008

Nucleotídeos Radioativos

³²P-dNTPs

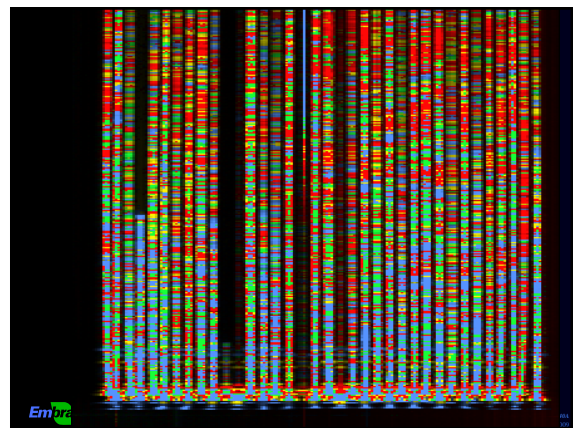
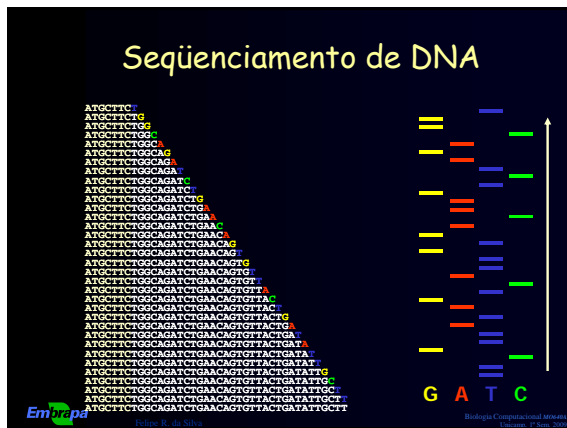
A incorporação de nucleotídeos de ³²P resulta em fragmentos radioativos que podem ser facilmente detectados por autoradiografia ou contagem por cintilação. A incorporação de nucleotídeos de ³²P é mais eficiente quando os nucleotídeos são adicionados ao 5' extremo da cadeia de DNA.

Nucleotídeo	Isótopo	Tempo de vida
³² P	³² P	14.3 dias
³³ P	³³ P	25.3 dias

³³P-dNTPs

A incorporação de nucleotídeos de ³³P resulta em fragmentos radioativos que podem ser facilmente detectados por autoradiografia ou contagem por cintilação. A incorporação de nucleotídeos de ³³P é mais eficiente quando os nucleotídeos são adicionados ao 3' extremo da cadeia de DNA.

Embrapa | Felipe R. da Silva | Biologia Computacional: Métodos | Volume 1 | São Carlos, 2008



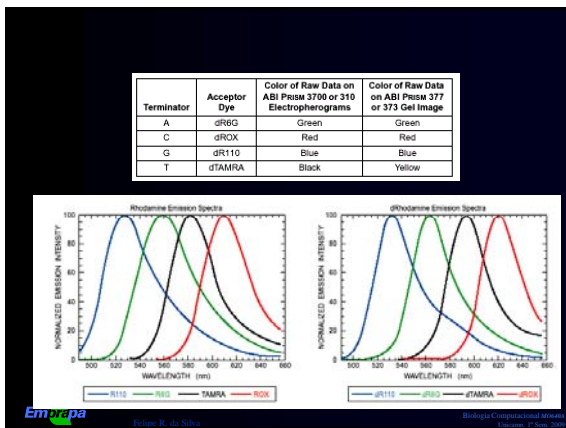
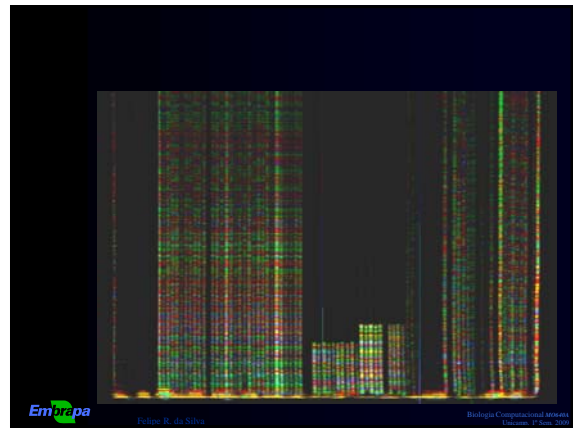
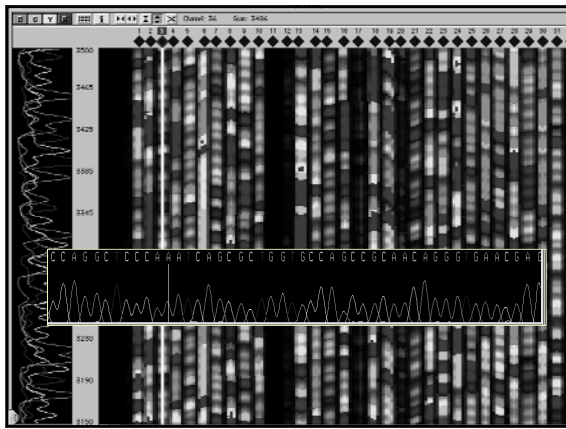


Table 2-4. ABI Prism 310, ABI 373 with BigDye 3 Filter Wheel, and ABI Prism 377 Chemistry Recommendations

	dRhodamine Terminator	BigDye Terminator	BigDye Primer
DNA Sequencing Application			
De novo sequencing—high throughput	S	R	R
De novo sequencing—mid/low throughput	S	R	S
Comparative sequencing (genome mutations 50-50 heterozygotes)	S	R	R
Comparative sequencing (nontoxic mutations 50-70 heterozygotes)	N	S	R
Comparative sequencing (nontoxic mutations 50-50 heterozygotes)	N	N	S
Gene walking (custom primers)	S	R	N
Shotgun sequencing (universal primers, M13)	S	R	R
Shotgun sequencing (universal primers)	S	R	R
Gap closure (custom primers)	S	R	N
DNA Sequence Context			
GC-rich regions	S	R	S
AT-rich regions	R	R	R
UTR-rich regions	R	N	R
Homopolymer A or T >25 bp	R	N	R
Template			
Phased (<15 kb)	R	R	R
M13	R	R	R
TAAC, coxIII, lambdaII, large PCR product	S	R	S
Substrate gel-filled DNA	R	R	N
PCR amplicon	R	R	R
PCR amplicon (heterozygous 50:50)	S	R	R
PCR amplicon (heterozygous 50:50)	N	S	R
PCR amplicon (heterozygous 50:50)	N	N	S

A, All cycle sequencing chemistries can have difficulty with homopolymer >40 bp.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA
Vol. 74, No. 2, pp. 560-564, February 1977
Biochemistry

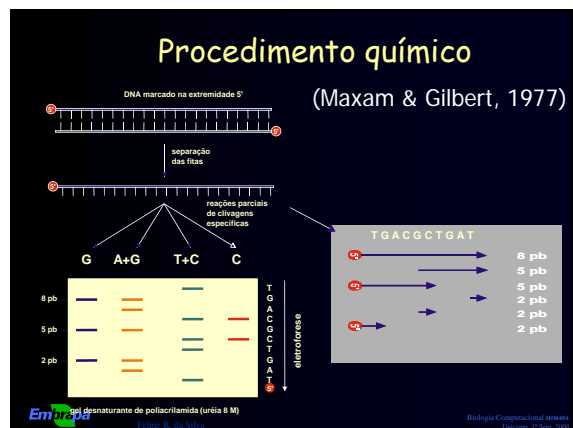
A new method for sequencing DNA

(DNA chemistry/dimethyl sulfate cleavage/hydrazone/piperidine)

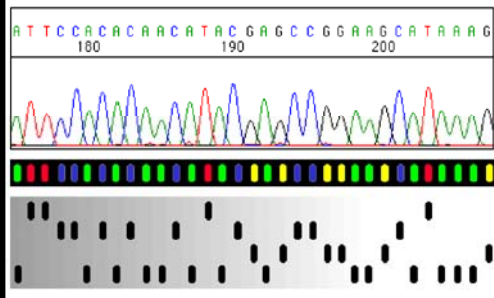
ALLAN M. MAXAM AND WALTER GILBERT

Department of Biochemistry and Molecular Biology, Harvard University, Cambridge, Massachusetts 02138

Contributed by Walter Gilbert, December 9, 1976



Seqüenciamento de DNA



Embrapa

Pedro B. de Sá

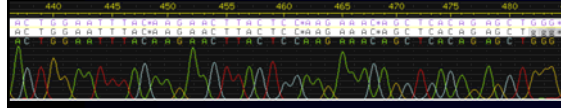
Biologia Computacional Mestrado
Tutoria: 17/06/2019

Seqüenciamento de DNA

1996, tese de mestrado:

```
Q..S..S..P..L..P..A..L..M..A..A..Q..L..A..Q..Q..L..L..L..M.. 57  
AGTCGTACCCTCCCGGCCCTGATGGGCGCCGAAAATCCACAGCAACTGAGCCTATCT 207  
AGCCGCTC.....CCCTGATGGGCGCCGAAAATCCACAGCAACTGAGCCTATCT 423  
AGCCGCTC.....CCCTGATGGGCGCCGAAAATCCACAGCAACTGAGCCTATCT 559  
G..P..L.....A..L..M..A..A..Q..L..A..Q..Q..L..L..L..M.. 50
```

2000, tese de doutorado:



Embrapa

Pedro B. de Sá

Biologia Computacional Mestrado
Tutoria: 17/06/2019