


# Seqüenciamento



**Embrapa**  
Recursos Genéticos e Biotecnologia

**BRASIL**  
A NATION FOR ALL  
GOVERNO FEDERAL

## 1977: Walter Gilbert e Frederick Sanger seqüenciamento de DNA



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

**Embrapa**  
Felipe R. da Silva

Biologia Computacional *MO6604*  
Unicamp, 1º Sem. 2009

*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  $\phi$ 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**  
Felipe R. da Silva

Biologia Computacional *MO6604*  
Unicamp, 1º Sem. 2009

## Procedimento enzimático

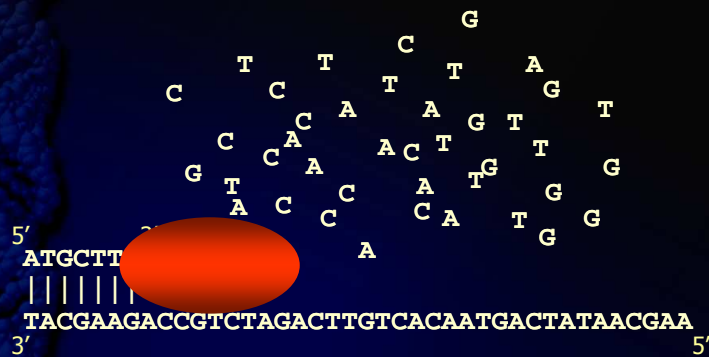
(Sanger, 1977)

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

**Embrapa**  
Felipe R. da Silva

Biologia Computacional *MO6604*  
Unicamp, 1º Sem. 2009

## Polimerização de DNA

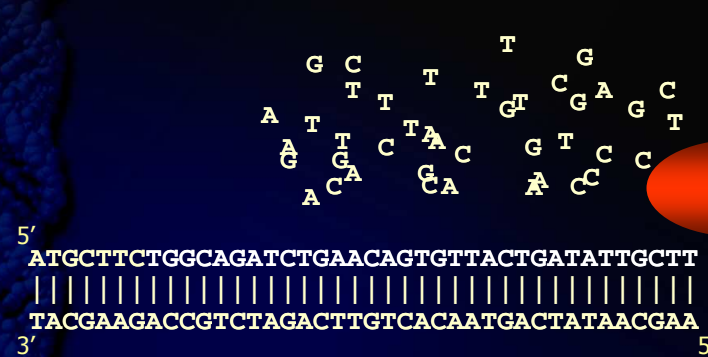


Embrapa

Felipe R. da Silva

Biologia Computacional M06404  
Unicamp, 1º Sem, 2009

## Polimerização de DNA

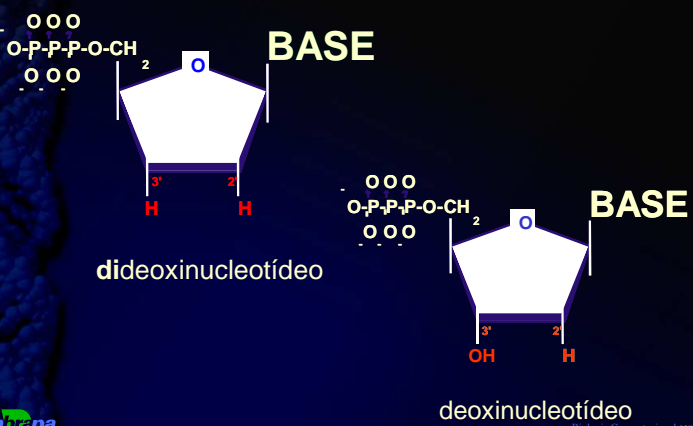


Embrapa

Felipe R. da Silva

Biologia Computacional M06404  
Unicamp, 1º Sem, 2009

## Dideoxynucleotídeo

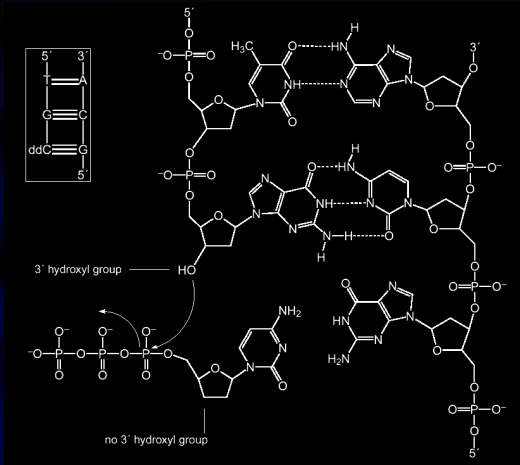


Embrapa

Felipe R. da Silva

Biologia Computacional M06404  
Unicamp, 1º Sem, 2009

## Seqüenciamento de DNA



Embrapa

Felipe R. da Silva

Biologia Computacional M06404  
Unicamp, 1º Sem, 2009

## Polimerização de DNA *o dideoxi*

5' ATGCTTCTGGCAGAT 3'  
3' TACGAAGACCGTCTAGACTTGTCAAAATGACTATAACGAA 5'

Embrapa  
Felipe R. da Silva  
Biologia Computacional M06604  
Unicamp, 1º Sem, 2009

## Polimerização de DNA *o dideoxi*

5' ATGCTTCTGGCAGAT 3'  
3' TACGAAGACCGTCTAGACTTGTCAAAATGACTATAACGAA 5'

Embrapa  
Felipe R. da Silva  
Biologia Computacional M06604  
Unicamp, 1º Sem, 2009

## Seqüenciamento de DNA

5' ATGCTTCTGGCAGAT 3'  
3' TACGAAGACCGTCTAGACTTGTCAAAATGACTATAACGAA 5'

Embrapa  
Felipe R. da Silva  
Biologia Computacional M06604  
Unicamp, 1º Sem, 2009

## Seqüenciamento de DNA

5' ATGCTTCTGGCAGAT 3'  
3' TACGAAGACCGTCTAGACTTGTCAAAATGACTATAACGAA 5'

- molde
- polimerase
- dNTPs

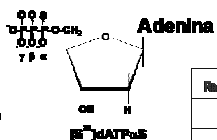
•ddGTPs    •ddATPs    •ddTTPs    •ddCTPs

Embrapa  
Felipe R. da Silva  
Biologia Computacional M06604  
Unicamp, 1º Sem, 2009

# Nucleotídeos Radioativos

## [S<sup>32</sup>]dNTPαS

A baixa energia de emissão β do S<sup>32</sup> resulta em bandas mais nítidas que aumentam a eficiência de leitura no topo do gel. A menor energia também provoca menor número de clivagens permitindo o armazenamento das reações por tempos mais prolongados do que as reações com incorporação de P<sup>32</sup>.



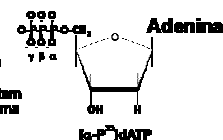
Radionúclido	Meia-vida	Energia (MeV)
S <sup>32</sup>	87,4 dias	0,157
P <sup>32</sup>	14,3 dias	1,710
P <sup>33</sup>	25,3 dias	0,248

## [P<sup>32</sup>]dNTP

A maior energia de emissão β do P<sup>32</sup> apresenta a vantagem de menores tempos de exposição, no entanto apresenta menor resolução e estabilidade das reações que não devem ser armazenadas por tempos prolongados.

## [P<sup>33</sup>]dNTP

As partículas β emitidas por P<sup>33</sup> apresentam energia média 50% superior a de S<sup>32</sup>. As sequências geradas utilizando-se P<sup>33</sup> apresentam tempos de exposição mais curtos e de mesma resolução de aquelas obtidas com S<sup>32</sup>.



Embrapa

Felipe R. da Silva

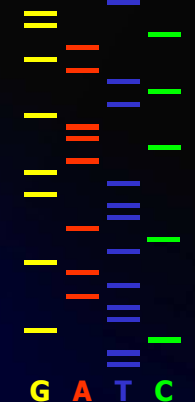
Biologia Computacional M06604  
Unicamp, 1º Sem. 2009

# Sequenciamento de DNA

```

ATGCTTCT
ATGCTTCTG
ATGCTTCTGG
ATGCTTCTGGC
ATGCTTCTGGCA
ATGCTTCTGGCAG
ATGCTTCTGGCAGT
ATGCTTCTGGCAGTA
ATGCTTCTGGCAGTCTG
ATGCTTCTGGCAGTCTGA
ATGCTTCTGGCAGTCTGAAC
ATGCTTCTGGCAGTCTGAACAG
ATGCTTCTGGCAGTCTGAACAGT
ATGCTTCTGGCAGTCTGAACAGTG
ATGCTTCTGGCAGTCTGAACAGTGA
ATGCTTCTGGCAGTCTGAACAGTGAAT
ATGCTTCTGGCAGTCTGAACAGTGAATG
ATGCTTCTGGCAGTCTGAACAGTGAATTG
ATGCTTCTGGCAGTCTGAACAGTGAATTTG
ATGCTTCTGGCAGTCTGAACAGTGAATTTGCT
ATGCTTCTGGCAGTCTGAACAGTGAATTTGCTT

```



Embrapa

Felipe R. da Silva

Biologia Computacional M06604  
Unicamp, 1º Sem. 2009

# Sequenciamento de DNA

```

ATGCTTCT
ATGCTTCTG
ATGCTTCTGG
ATGCTTCTGGC
ATGCTTCTGGCA
ATGCTTCTGGCAGT
ATGCTTCTGGCAGTCTG
ATGCTTCTGGCAGTCTGA
ATGCTTCTGGCAGTCTGAAC
ATGCTTCTGGCAGTCTGAACAG
ATGCTTCTGGCAGTCTGAACAGT
ATGCTTCTGGCAGTCTGAACAGTG
ATGCTTCTGGCAGTCTGAACAGTGA
ATGCTTCTGGCAGTCTGAACAGTGAAT
ATGCTTCTGGCAGTCTGAACAGTGAATTG
ATGCTTCTGGCAGTCTGAACAGTGAATTTG
ATGCTTCTGGCAGTCTGAACAGTGAATTTGCT
ATGCTTCTGGCAGTCTGAACAGTGAATTTGCTT

```



Embrapa

Felipe R. da Silva

Biologia Computacional M06604  
Unicamp, 1º Sem. 2009



Biologia Computacional M06604  
Unicamp, 1º Sem. 2009





Felipe R. da Silva

Biologia Computacional 406664  
Unicamp, 1º Sem, 2009



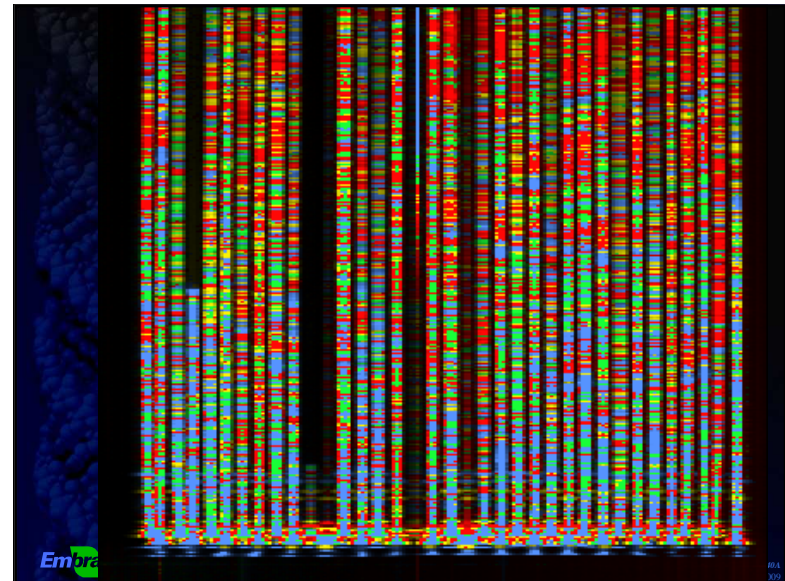
Felipe R. da Silva

Biologia Computacional 406664  
Unicamp, 1º Sem, 2009

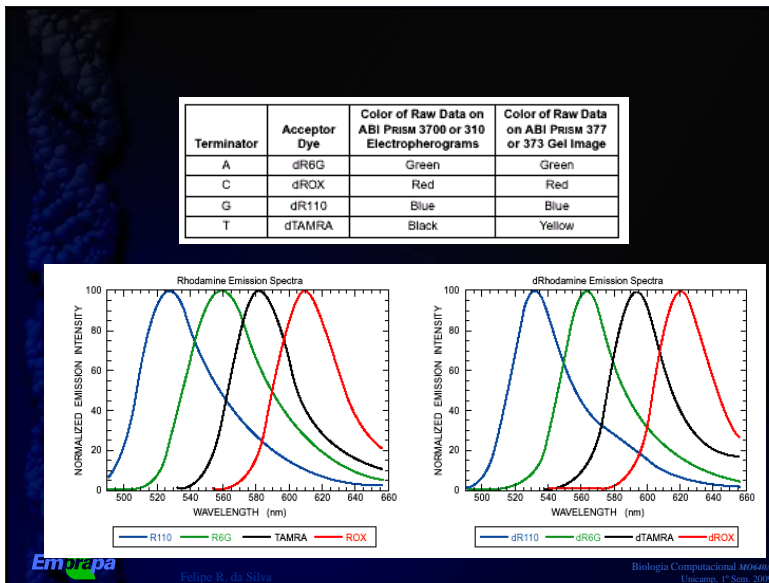
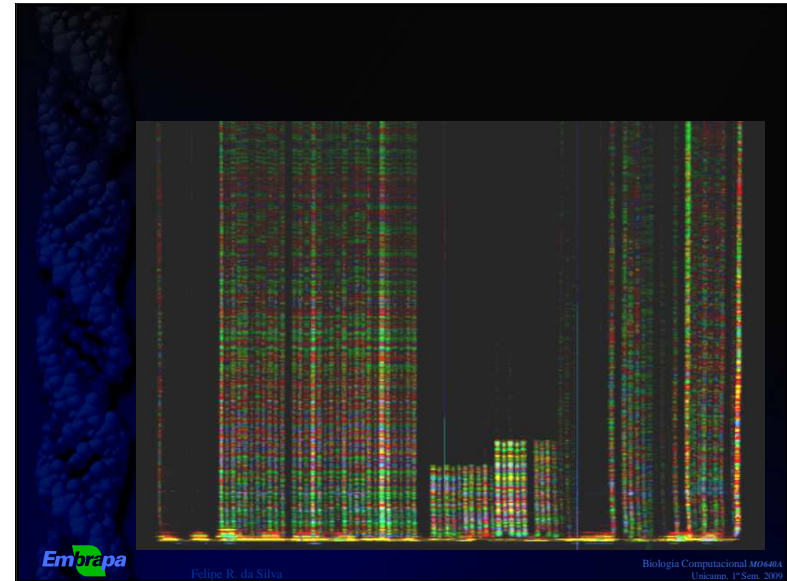
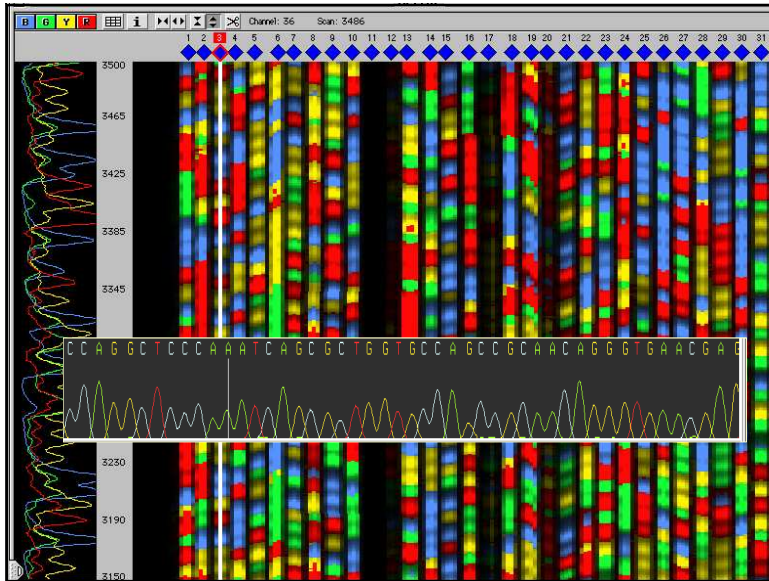


Felipe R. da Silva

Biologia Computacional 406664  
Unicamp, 1º Sem, 2009



#4  
X9



**Table 2-6** ABI PRISM 310, ABI 373 with BigDye Filter Wheel, and ABI PRISM 377 Chemistry Recommendations

	dRhodamine Terminator	BigDye Terminator	BigDye Primer
<b>DNA Sequencing Application</b>			
<i>De novo</i> sequencing—high throughput	S	R <sup>a</sup>	R
<i>De novo</i> sequencing—mid-to-low throughput	S	R	S
Comparative sequencing (germline mutations 50:50 heterozygotes)	S	R	R
Comparative sequencing (somatic mutations 30:70 heterozygotes)	N	S	R
Comparative sequencing (somatic mutations 10:90 heterozygotes)	N	N	S
Gene walking (custom primers)	S	R	N
Shotgun sequencing (universal primers, M13)	S	R	R
Deletion clone sequencing (universal primers)	S	R	R
Gap closure (custom primers)	S	R	N
<b>DNA Sequence Context</b>			
GC-rich >65%	S	R	S
AT-rich >65%	R	R	R
GT-rich regions	R	N	R
Homopolymer A or T >25 bp <sup>b</sup>	R	N	R
<b>Template</b>			
Plasmid (<15 kb)	R	R	R
M13	R	R	R
BAC, cosmid, lambda, large PCR product	S	R	S
Bacterial genomic DNA	N	R	N
PCR amplicon	R	R	R
PCR amplicon (heterozygous 50:50)	S	R	R
PCR amplicon (heterozygous 30:70)	N	S	R
PCR amplicon (heterozygous 10:90)	N	N	S

a. R = recommended, S = satisfactory, N = not recommended  
b. All cycle sequencing chemistries can have difficulties with homopolymers >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/hydrazine/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

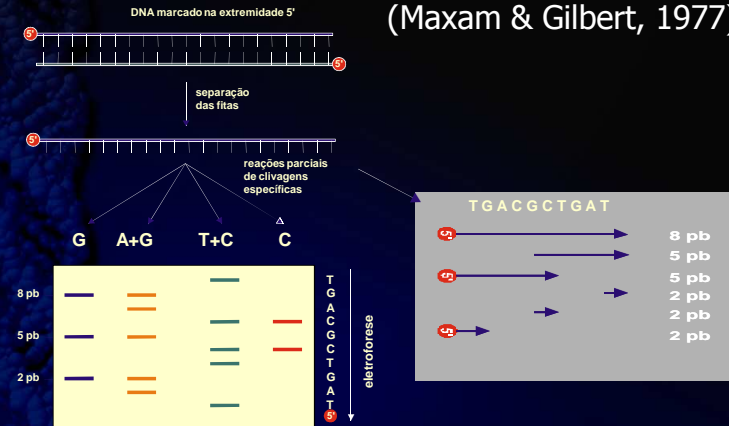
Embrapa

Felipe R. da Silva

Biologia Computacional M06604  
 Unicamp, 1º Sem, 2009

## Procedimento químico

(Maxam & Gilbert, 1977)

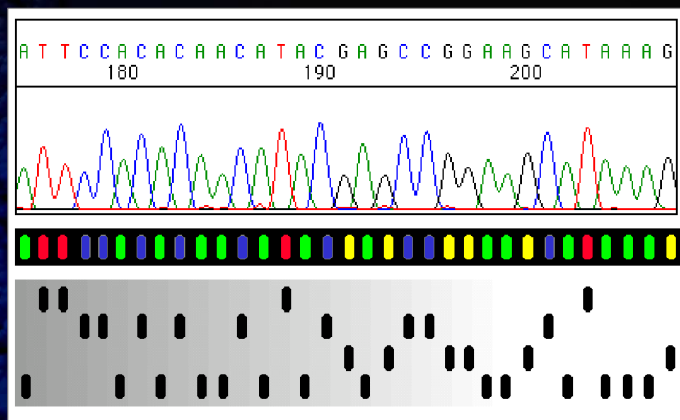


Embrapa

Felipe R. da Silva

Biologia Computacional M06604  
 Unicamp, 1º Sem, 2009

## Seqüenciamento de DNA



Embrapa

Felipe R. da Silva

Biologia Computacional M06604  
 Unicamp, 1º Sem, 2009

## Seqüenciamento de DNA

1996, tese de mestrado:

Q. S. S. P. L. P. A. L. M. A. A. Q. I. A. Q. Q. L. T. M. 57  
 AGTCGTCACCGCTCCCGGCGCTGATGGGGCCSAAA TAGCACAGCAACTGACCGCGATGT 2075  
 AGCCGCTC . . . . . GCGCTGATGGCGGCG?AAATAGDE?AGCAACTGACCGAGATGT 420  
 AGCCGCTC . . . . . GCGCTGATGGCGGCGSAAA TAGCGAGCAACTGACCGCGATGT 559  
 Q. P. L. . . . . A. L. M. A. A. Q. I. A. Q. Q. L. T. M. 50

2000, tese de doutorado:



Embrapa

Felipe R. da Silva

Biologia Computacional M06604  
 Unicamp, 1º Sem, 2009