ӘЛ-ФАРАБИ АТЫНДАҒЫ ҚАЗАҚ ҰЛТТЫҚ УНИВЕРСИТЕТІ
БИОЛОГИЯ ЖӘНЕ БИОТЕХНОЛОГИЯ ФАКУЛЬТЕТІ
МОЛЕКУЛАЛЫҚ БИОЛОГИЯ ЖӘНЕ ГЕНЕТИКА КАФЕДРАСЫ

Пән атауы: Геномика және молекулалық диагностика

Дәріс 14

ДНҚ секвенирлеу. Сэнгер секвенирлеу әдісінің принципі

Лектор: к.б.н., Алтыбаева Н. А.

Сабақтың мақсаты:

ДНҚ секвенирлеу әдісінің негізгі принциптерін түсіндіру, Сэнгер секвенирлеу әдісінің жүргізілу кезеңдерін және қолданылатын негізгі компоненттерді сипаттау, сондай-ақ алынған нәтижелерді талдау жолдарын және әдістің молекулалық диагностикадағы маңызын қарастыру.

Оқыту нәтижелері
Дәрісті меңгергеннен кейін магистрант:

1. ДНҚ секвенирлеу ұғымын және оның молекулалық-генетикалық зерттеулердегі маңызын түсіндіре алады.
2. Сэнгер секвенирлеу әдісінің ғылыми негіздерін және жұмыс принципін сипаттай алады.
3. ДНҚ-полимераза, праймерлер, dNTP және ddNTP молекулаларының қызметтерін ажырата алады.
4. Дидезоксинуклеотидтердің ДНҚ тізбегінің ұзаруын тоқтату механизмін түсіндіре алады.
5. Сэнгер секвенирлеуінің негізгі зертханалық кезеңдерін сипаттай алады.
6. Капиллярлық электрофорез және флуоресценттік детекцияның жұмыс принциптерін талдай алады.
7. Секвенирлеу нәтижесінде алынған хроматограммаларды интерпретациялайды.
8. Сэнгер және жаңа буын секвенирлеу (NGS) технологияларының аналитикалық ерекшеліктерін салыстыра алады.
9. Сэнгер секвенирлеуінің тұқым қуалайтын аурулар диагностикасындағы қолданылуын Бағалай алады.

Дәрістің жоспары

1. ДНҚ секвенирлеудің молекулалық негіздері, даму тарихы және нуклеотидтік тізбекті анықтау принциптері.
2. Сэнгер секвенирлеу әдісінің механизмі: дидезоксинуклеотидтер, тізбектің терминациясы, капиллярлық электрофорез және флуоресценттік детекция.
3. Секвенирлеу нәтижелерін талдау, хроматограммаларды интерпретациялау және Сэнгер әдісінің молекулалық диагностикадағы қолданылуы

ДНҚ секвенирлеу әдісіне жалпы сипаттама

ДНҚ секвенирлеу – ДНҚ молекуласындағы нуклеотидтердің орналасу ретін анықтайтын молекулалық-генетикалық әдіс.

- ДНҚ төрт түрлі нуклеотидтен тұрады: аденин (А), тимин (Т), гуанин (Г) және цитозин (Ц). Секвенирлеу әдісі осы нуклеотидтердің қандай ретпен орналасқанын анықтауға мүмкіндік береді.

Бұл әдісті жүргізу үшін алдымен қаннан, сілекейден немесе басқа биологиялық материалдан ДНҚ бөлініп алынады. Кейін зерттелетін ДНҚ арнайы құрылғылардың көмегімен талдауға дайындалады. **Секвенатор** деп аталатын құрылғы ДНҚ құрамындағы нуклеотидтердің орналасу ретін анықтайды.

- Алынған нәтижелер компьютерлік бағдарламалар арқылы талданып, ДНҚ тізбегіндегі генетикалық өзгерістер мен мутациялар анықталады.



ДНҚ секвенирлеудің негізгі түрлеріне Сэнгер әдісі, жаңа буын секвенирлеуі (NGS) және үшінші буын секвенирлеуі жатады. Сэнгер әдісі ДНҚ-ның белгілі бір бөлігін зерттеуге қолданылады. NGS технологиясы көптеген ДНҚ фрагменттерін бір уақытта талдауға мүмкіндік береді. Ал үшінші буын секвенирлеуі ұзын ДНҚ молекулаларын оқуға арналған.

ДНҚ секвенирлеу медицинада, генетикада және биотехнологияда кеңінен қолданылады. Бұл әдіс арқылы тұқым қуалайтын ауруларды зерттеуге, генетикалық мутацияларды анықтауға, қатерлі ісік жасушаларындағы өзгерістерді талдауға және микроорганизмдердің генетикалық құрылымын зерттеуге болады.

Сэнгер секвенирлеу әдісінің негізгі принципі



Сэнгер секвенирлеу әдісі – ДНҚ молекуласындағы нуклеотидтердің орналасу ретін анықтайтын молекулалық-генетикалық әдіс. Бұл әдісті 1977 жылы ғалым **Фредерик Сэнгер** ұсынған.
Әдістің негізгі принципі – ДНҚ тізбегінің синтезін арнайы нуклеотидтердің көмегімен тоқтату.

- Алдымен зерттелетін ДНҚ-ның екі тізбегі бір-бірінен ажыратылады. Содан кейін ДНҚ-ның бір тізбегі үлгі ретінде алынып, оған праймер, ДНҚ-полимераза ферменті және нуклеотидтер қосылады. Праймер – жаңа ДНҚ тізбегінің синтезін бастауға көмектесетін қысқа ДНҚ бөлігі. Ал ДНҚ-полимераза – жаңа ДНҚ тізбегін құрастыратын фермент.

Бұл әдістің басты ерекшелігі – реакцияға кәдімгі нуклеотидтермен (dNTP) қатар арнайы дидезоксинуклеотидтердің (ddNTP) қосылуы. Дидезоксинуклеотидтер жаңа ДНҚ тізбегіне қосылған кезде оның әрі қарай ұзаруын тоқтатады. Себебі олардың құрамында келесі нуклеотидтің жалғануына қажетті 3'-OH тобы болмайды.

- **Нәтижесінде** ұзындықтары әртүрлі көптеген ДНҚ фрагменттері түзіледі. Әр фрагменттің соңында арнайы дидезоксинуклеотид орналасады. Қазіргі Сэнгер әдісінде бұл нуклеотидтер әртүрлі флуоресцентті бояғыштармен белгіленеді.

Кейін түзілген ДНҚ фрагменттері **капиллярлық электрофорез** арқылы ұзындықтарына қарай бөлінеді. Қысқа фрагменттер ұзын фрагменттерге қарағанда жылдамырақ қозғалады. Арнайы детектор әр фрагменттің соңындағы флуоресцентті белгіні анықтайды. Компьютер осы белгілердің ретін талдап, ДНҚ тізбегіндегі аденин, тимин, гуанин және цитозин нуклеотидтерінің орналасу ретін көрсетеді.

Сэнгер секвенирлеу әдісінің тарихы



Сэнгер секвенирлеу әдісін 1977 жылы британдық биохимик Фредерик Сэнгер (Frederick Sanger) және оның әріптестері ұсынды. Бұл әдіс ДНҚ молекуласындағы нуклеотидтердің орналасу ретін анықтауға мүмкіндік берді.
Әдістің негізінде **дидезоксинуклеотидтерді (ddNTP)** пайдалану арқылы ДНҚ тізбегінің синтезін тоқтату принципі жатыр. Осы арқылы әртүрлі ұзындықтағы ДНҚ фрагменттері түзіліп, олардың көмегімен нуклеотидтердің орналасу реті анықталады.

- 1980 жылы Фредерик Сэнгер ДНҚ-ның нуклеотидтік тізбегін анықтау әдістерін дамытуға қосқан үлесі үшін химия саласындағы екінші Нобель сыйлығын алды.
- 1980-жылдардың екінші жартысында флуоресцентті таңбалау мен автоматтандырылған секвенаторлардың дамуына байланысты Сэнгер әдісі жетілдірілді. Нәтижесінде ДНҚ тізбегін анықтау жылдамдығы мен тиімділігі артты.
- 1990–2003 жылдары Сэнгер секвенирлеу әдісі «Адам геномы» халықаралық жобасында кеңінен қолданылды. Бұл жоба адам геномының нуклеотидтік тізбегін анықтауға үлкен үлес қосты.

Қазіргі уақытта Сэнгер секвенирлеу әдісі молекулалық диагностикада, генетикалық өзгерістерді анықтауда және басқа секвенирлеу әдістерінің нәтижелерін растауда қолданылады.

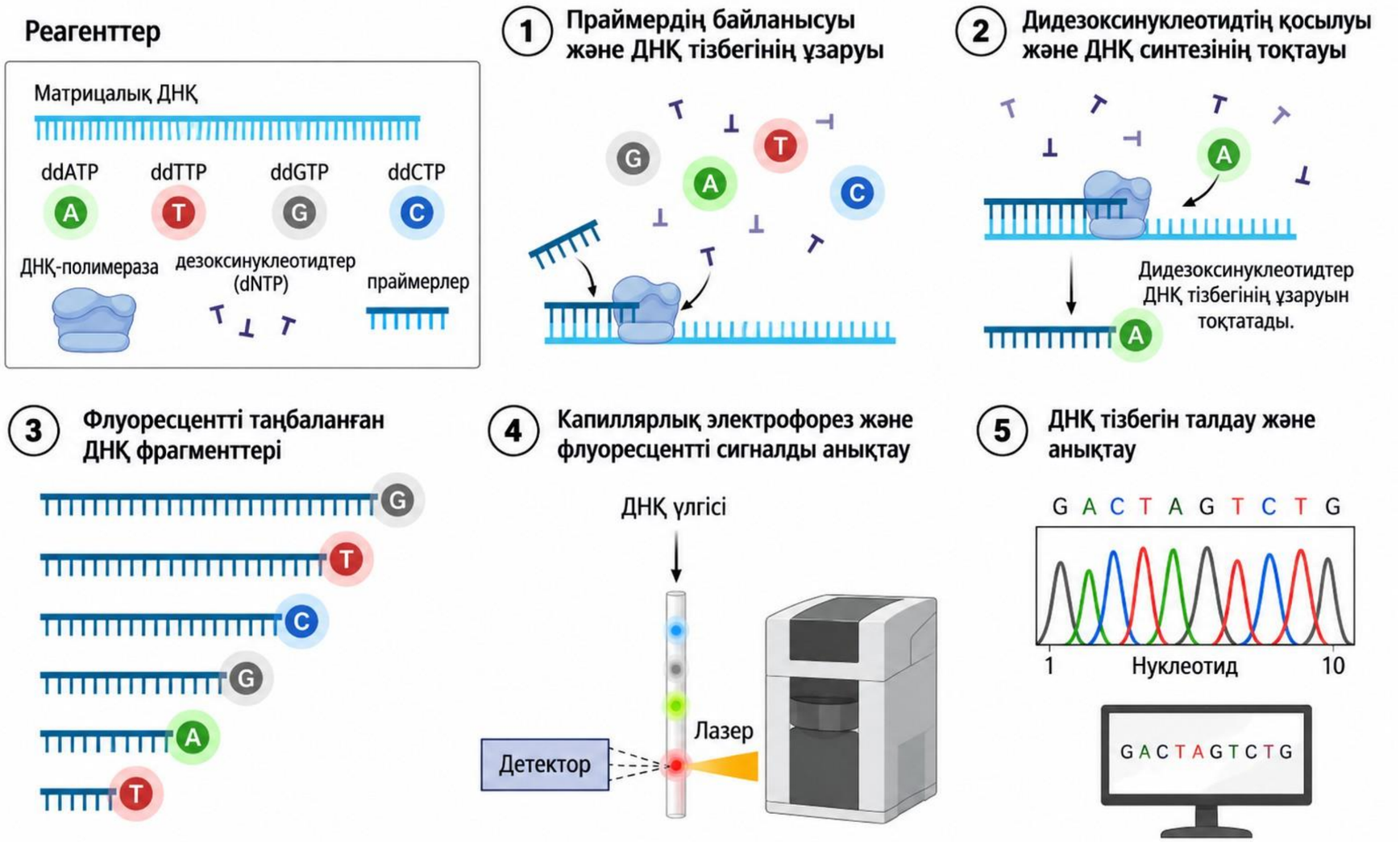
Сэнгер секвенирлеу әдісінде қолданылатын негізгі компоненттер

Сэнгер секвенирлеу әдісінде ДНҚ-ның нуклеотидтік ретін анықтау үшін бірнеше негізгі компонент қолданылады. Олардың әрқайсысы ДНҚ тізбегінің синтезделуіне және оның белгілі бір жерде тоқтауына қатысады.

- **Бірінші компонент** – матрицалық ДНҚ. Бұл – нуклеотидтік ретін анықтау қажет ДНҚ бөлігі. Ол жаңа ДНҚ тізбегін синтездеу үшін үлгі ретінде пайдаланылады.
- **Екінші компонент** – праймер. Праймер – матрицалық ДНҚ-ның белгілі бір бөлігіне байланысатын қысқа ДНҚ тізбегі. Оның негізгі қызметі – ДНҚ-полимераза ферментіне жаңа тізбекті синтездеуді бастауға мүмкіндік беру.
- **Үшінші компонент** – ДНҚ-полимераза ферменті. Бұл фермент матрицалық ДНҚ-ға сәйкес жаңа нуклеотидтерді бірінен кейін бірін қосып, жаңа ДНҚ тізбегін синтездейді.
- **Төртінші компонент** – кәдімгі нуклеотидтер (dNTP). Оларға дезоксиаденозинтрифосфат (dATP), дезокситимидинтрифосфат (dTTP), дезоксигуанозинтрифосфат (dGTP) және дезоксицитидинтрифосфат (dCTP) жатады. Бұл нуклеотидтер жаңа ДНҚ тізбегінің құрылыс материалы болып саналады және оның ұзаруын қамтамасыз етеді.
- **Бесінші компонент** – дидезоксинуклеотидтер (ddNTP). Бұлар Сэнгер әдісіндегі ең маңызды компоненттердің бірі. Оларға ddATP, ddTTP, ddGTP және ddCTP жатады. Олардың кәдімгі нуклеотидтерден айырмашылығы – құрамында 3'-OH тобы болмайды. Сондықтан дидезоксинуклеотид жаңа ДНҚ тізбегіне қосылған кезде оның әрі қарай ұзаруы тоқтайды. Қазіргі Сэнгер секвенирлеуінде әртүрлі дидезоксинуклеотидтер арнайы флуоресцентті бояғыштармен белгіленеді. Бұл олардың қай нуклеотид екенін анықтауға мүмкіндік береді.
- **Алтыншы компонент** – реакциялық буфер және магний иондары (Mg^{2+}). Буфер реакцияның жүруіне қажетті ортаны қамтамасыз етеді, ал магний иондары ДНҚ-полимераза ферментінің дұрыс жұмыс істеуі үшін қажет.

Осы компоненттердің барлығы бір реакциялық қоспаға қосылады. ДНҚ-полимераза жаңа тізбекті синтездей бастайды, ал дидезоксинуклеотидтердің кездейсоқ қосылуы нәтижесінде әртүрлі ұзындықтағы ДНҚ фрагменттері түзіледі. Кейін олар капиллярлық электрофорез арқылы бөлініп, флуоресцентті белгілерінің көмегімен нуклеотидтердің орналасу реті анықталады.

Сэнгер секвенирлеу әдісінің негізгі кезеңдері



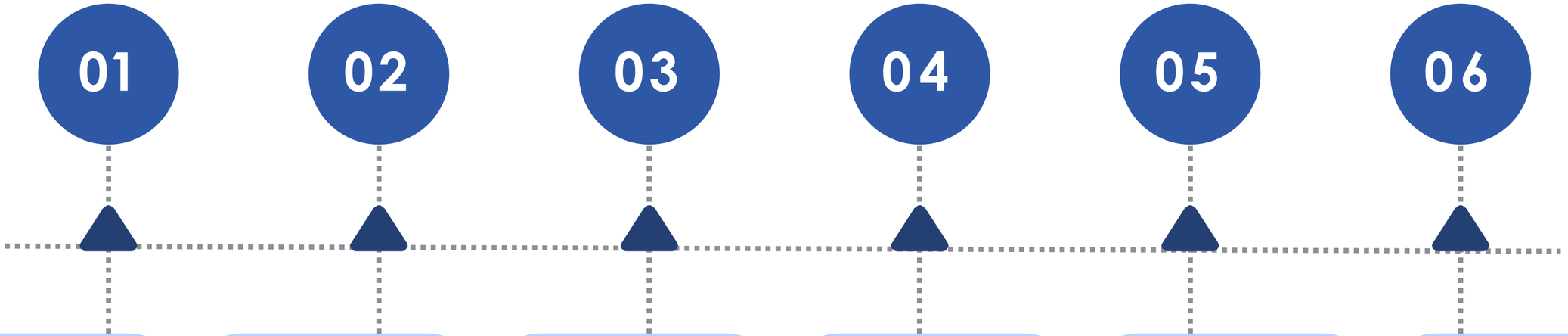
Сэнгер секвенирлеу әдісінің негізгі кезеңдері

- **Бірінші кезең** – ДНҚ-ны дайындау. Алдымен зерттелетін биологиялық материалдан ДНҚ бөлініп алынады. Қажет болған жағдайда ДНҚ-ның зерттелетін бөлігі полимеразалық тізбекті реакция (ПТР) арқылы көбейтіледі. Кейін ДНҚ тізбектері бір-бірінен ажыратылып, бір тізбегі матрица ретінде пайдаланылады.
- **Екінші кезең** – реакциялық қоспаны дайындау. Зерттелетін ДНҚ-ға праймер, ДНҚ-полимераза ферменті, кәдімгі нуклеотидтер (dNTP), дидезоксинуклеотидтер (ddNTP), буфер және магний иондары қосылады. Праймер жаңа ДНҚ тізбегінің синтезін бастауға мүмкіндік береді, ал ДНҚ-полимераза нуклеотидтерді бірінен кейін бірін жалғайды.
- **Үшінші кезең** – ДНҚ тізбегінің синтезі және тоқтатылуы. ДНҚ-полимераза матрицалық ДНҚ-ға сәйкес жаңа тізбекті синтездей бастайды. Синтез барысында кәдімгі нуклеотидтердің орнына кейде дидезоксинуклеотидтер қосылады. Олардың құрамында 3'-ОН тобы болмағандықтан, жаңа нуклеотид жалғана алмайды және ДНҚ синтезі тоқтайды. Нәтижесінде ұзындықтары әртүрлі көптеген ДНҚ фрагменттері түзіледі.
- **Төртінші кезең** – ДНҚ фрагменттерін бөлу. Түзілген фрагменттер капиллярлық электрофорез әдісі арқылы ұзындықтарына қарай ажыратылады. Қысқа ДНҚ фрагменттері жылдамырақ, ал ұзын фрагменттер баяуырақ қозғалады. Осылайша фрагменттер бірінен кейін бірі анықтау жүйесінен өтеді.
- **Бесінші кезең** – нуклеотидтердің ретін анықтау. Әрбір ДНҚ фрагментінің соңында флуоресцентті бояғышпен белгіленген дидезоксинуклеотид болады. Арнайы детектор осы бояғыштардың сигналын тіркейді. Әр нуклеотидке сәйкес келетін сигнал компьютер арқылы өңделіп, ДНҚ тізбегінің нуклеотидтік реті анықталады. Нәтиже түрлі түсті шыңдардан тұратын хроматограмма түрінде көрсетіледі.
- **Алтыншы кезең** – нәтижені талдау. Алынған ДНҚ тізбегі компьютерлік бағдарламалар арқылы тексеріліп, қажет болған жағдайда эталондық ДНҚ тізбегімен салыстырылады. Осы арқылы нуклеотидтердің ауысуы, қосылуы немесе түсіп қалуы сияқты генетикалық өзгерістер анықталуы мүмкін.

Сэнгер секвенирлеу нәтижелерін талдау

Талдау кезеңдері	Сипаттамасы	Нәтижесі
1. Хроматограмманы талдау	ДНҚ нуклеотидтері түрлі түсті шыңдар арқылы көрсетіледі. A – жасыл, T – қызыл, G – қара, C – көк.	Нуклеотидтердің орналасу реті анықталады.
2. ДНҚ тізбегінің сапасын бағалау	Хроматограммадағы шыңдардың анықтығы, фондық сигнал және нуклеотидтердің дұрыс анықталуы тексеріледі.	Сапасыз аймақтар алынып тасталып, сенімді ДНҚ тізбегі таңдалады.
3. Референстік тізбекпен салыстыру	Алынған ДНҚ тізбегі белгілі референстік тізбекпен арнайы бағдарламалар арқылы салыстырылады.	Нуклеотидтік айырмашылықтар анықталады.
4. Генетикалық өзгерістерді анықтау	Нуклеотидтердің алмасуы, делеция (түсіп қалу) және инсерция (қосылу) сияқты өзгерістер зерттеледі.	Генетикалық варианттың түрі мен орналасқан орны анықталады.
5. Нәтижелерді интерпретациялау	Анықталған генетикалық варианттың биологиялық және клиникалық маңызы бағаланады.	Варианттың ген қызметіне ықтимал әсері туралы қорытынды жасалады.

Сэнгер секвенирлеу әдісінің молекулалық диагностикадағы маңызы



Тұқым қуалайтын ауруларды диагностикалау

белгілі гендердегі патогенді генетикалық варианттарды анықтауға мүмкіндік береді.

Генетикалық өзгерістерді анықтау

ДНҚ тізбегіндегі нуклеотидтердің алмасуын, делецияны және инсерцияны анықтау үшін қолданылады.

Генетикалық аурулардың тасымалдаушылығын анықтау

адамның белгілі бір тұқым қуалайтын ауруға байланысты генетикалық вариантты тасымалдауын зерттеуге көмектеседі.

Онкологиялық диагностика

ісік жасушаларындағы белгілі генетикалық өзгерістерді анықтауға мүмкіндік береді.

Пренаталдық диагностика

ұрықтағы белгілі тұқым қуалайтын ауруларға байланысты генетикалық өзгерістерді зерттеу үшін қолданылады.

Генетикалық зерттеу нәтижелерін растау

басқа молекулалық әдістермен анықталған генетикалық варианттарды қосымша тексеруге мүмкіндік береді.

Сэнгер секвенирлеу әдісінің артықшылықтары мен шектеулері

Артықшылықтары	Шектеулері
Жоғары дәлдік – ДНҚ тізбегіндегі нуклеотидтердің орналасу ретін жоғары дәлдікпен анықтайды.	**Зерттеу көлемінің шектеулі болуы** – бір реакцияда ДНҚ-ның салыстырмалы түрде қысқа фрагменті зерттеледі.
Генетикалық өзгерістерді анықтау – нуклеотидтердің алмасуын, кіші делециялар мен инсерцияларды анықтауға мүмкіндік береді.	**Көп уақытты қажет етуі** – көптеген гендерді зерттеу кезінде талдау ұзаққа созылады.
Нәтижелердің сенімділігі – сапалы хроматограммалар арқылы генетикалық өзгерістерді тексеруге мүмкіндік береді.	**Құнының жоғары болуы** – көптеген ДНҚ фрагменттерін жеке секвенирлеу қаржылық шығынды арттырады.
Нәтижелерді талдаудың қарапайымдылығы – хроматограмма арқылы нуклеотидтік тізбекті бағалауға болады.	**Төмен сезімталдық** – үлгідегі өте аз мөлшерде кездесетін генетикалық варианттарды анықтау қиын.
Молекулалық диагностикада қолданылуы – белгілі гендердегі өзгерістерді анықтау және басқа әдістердің нәтижелерін растау үшін қолданылады.	**Көптеген гендерді бір уақытта зерттей алмауы** – ауқымды генетикалық талдаулар үшін NGS әдісі тиімдірек.

Қорытынды

ДНҚ секвенирлеу – ДНҚ молекуласындағы нуклеотидтердің орналасу ретін анықтауға мүмкіндік беретін маңызды молекулалық-генетикалық әдіс. Сэнгер секвенирлеу әдісінің негізгі принципі ДНҚ синтезін арнайы дидезоксинуклеотидтер (ddNTP) арқылы тоқтатуға негізделген. Нәтижесінде әртүрлі ұзындықтағы ДНҚ фрагменттері түзіліп, олардың көмегімен нуклеотидтердің нақты тізбегі анықталады.

Сэнгер секвенирлеу әдісі жоғары дәлдігімен және нәтижелерінің сенімділігімен ерекшеленеді. Бұл әдіс генетикалық мутацияларды, нуклеотидтік алмасуларды және тұқым қуалайтын аурулармен байланысты өзгерістерді анықтауда кеңінен қолданылады. Сонымен қатар ПТР өнімдерін тексеруде және басқа секвенирлеу әдістерімен алынған нәтижелерді растауда маңызды рөл атқарады. Сондықтан Сэнгер секвенирлеуі қазіргі молекулалық диагностика мен генетикалық зерттеулердің негізгі әдістерінің бірі болып саналады.

Өзін-өзі тексеруге арналған сұрақтар

1. ДНҚ секвенирлеу дегеніміз не және оның негізгі мақсаты қандай?
2. Сэнгер секвенирлеу әдісінің молекулалық принципі қандай?
3. Сэнгер әдісінде қандай реакциялық компоненттер қолданылады?
4. dNTP және ddNTP молекулаларының құрылымдық айырмашылығы неде?
5. Дидезоксинуклеотидтер ДНҚ синтезін қандай механизм арқылы тоқтатады?
6. Сэнгер секвенирлеуінің негізгі зертханалық кезеңдерін сипаттаңыз.
7. Капиллярлық электрофорездің секвенирлеудегі қызметі қандай?
8. Секвенирлеу хроматограммасы дегеніміз не және ол қалай талданады?
9. Сэнгер секвенирлеуі мен NGS технологияларының негізгі айырмашылықтары қандай?

Пайдаланылған әдебиеттер тізімі

1. Берсімбаев Р. І. Молекулалық биология. – Алматы: Қазақ университеті, 2016.
2. Льюин Б. Гены. – М.: Бином. Лаборатория знаний, 2012.
3. Уилсон К., Уолкер Дж. Принципы и методы биохимии и молекулярной биологии. – Лаборатория знаний, 2021.