DNA SEQUENCE ANALYSIS

Introduction: DNA sequencing is the process of determining the precise order of nucleotides within a DNA molecule.

Methods or technology used to determine the order of four bases.

Purpose:

1. Deciphering the code of life
2. Detecting mutation
3. Typing microorganisms
4. Identifying human phenotypes
5. Designating polymorphism

History:

1. First discovered and isolated DNA by Friedrich Miescher (1869)
2. 1953, James Watson and Francis Crick's double-helix model of DNA
3. Frederick Sanger got two Nobel Prizes.
4. 1955: had completed the sequence of all the amino acids in insulin
5. First full DNA – bacteriophage in 0 x 174 in 1977

DNA sequencing methods: historically there are two main methods.

Maxam and Gilbert method: These methods are given by A.M. Maxam and W. Gilbert (1977) and are called chemical sequencing, which uses chemicals to treat DNA to cut it into fragments. Denature dsDNA to ssDNA by increasing temperature. Radioactively labelled one strand at the 5' end of the DNA fragment to be sequenced. Cleave DNA strands at specific positions using chemical reactions. E.g., formic acid (fire ant venom) to break DNA after both A and G, dimethyl sulfate (toxic) to break after G, and hydrazine (rocket fuel) to break after C and T, after C different fragments of different sizes. The fragments may then be separated by gel electrophoresis.

Sanger method: invented by Frederick Sanger in 1977, and he got the Nobel Prize in 1980. Also termed as chain termination or the dideoxy method. In dideoxynucleotide triphosphate (ddNTP) chain termination (having an H on the 3'C of the ribose sugar (normally OH found in dNTPs) and ssDNA addition of ddNTPs—elongation step). Mechanism—ssDNA (complementary strand)àenzymatic synthesis of complementary polynucleotide àtermination at specific nucleotide position àseparated between gel/capillary electrophoresisàread DNA sequence

Automated sequencing: based on the Sanger-Coulson method, with two notable differences from the standard procedure. Labeling of the product of automated PCR uses fluorescent labels in place of the radioactive labeling used in the standard procedure. Fluorescent label—usually attached to the four dideoxynucleotides. In the four-track system. In automated DNA sequencing, each of the four dideoxynucleotides is used in a separate reaction, and the products are run in 4 adjacent lanes of the gel. Different fluorochromes are attached to each of the four dideoxynucleotides (all of them are used in the same reaction in place of preparing a separate reaction for each dideoxynucleotide); single-track system reaction products are run in a single gel lane or capillary. DNA in thermal cycle sequencing/generate chain-terminated polynucleotide required for sequencing

Application of DNA sequencing

1. Forensic
2. Agriculture
3. Medicine

डीएनए अनुक्रम विश्लेषण

परिचय: डीएनए अनुक्रमण एक डीएनए अणु के भीतर न्यूक्लियोटाइड के सटीक क्रम को निर्धारित करने की प्रक्रिया है।

चार ठिकानों के क्रम को निर्धारित करने के लिए उपयोग किए जाने वाले तरीके या प्रौद्योगिकी।

उद्देश्य:

1। जीवन के कोड को कम करना

2। उत्परिवर्तन का पता लगाना

3। टाइपिंग सूक्ष्मजीव

4। मानव फेनोटाइप्स की पहचान करना

5। बहुरूपता को नामित करना

इतिहास:

1। फ्रेडरिक मीशर (1869) द्वारा पहली बार खोजा और अलग -थलग डीएनए

2। 1953, जेम्स वॉटसन और फ्रांसिस क्रिक के डीएनए के डबल-हेलिक्स मॉडल

3। फ्रेडरिक सेंगर को दो नोबेल पुरस्कार मिले।

4। 1955: इंसुलिन में सभी अमीनो एसिड का अनुक्रम पूरा कर लिया था

5। पहला पूर्ण डीएनए - 1977 में 0 x 174 में बैक्टीरियोफेज

डीएनए अनुक्रमण तरीके: ऐतिहासिक रूप से दो मुख्य तरीके हैं।

मैक्सम और गिल्बर्ट विधि: ये विधियाँ ए.एम. मैक्सम और डब्ल्यू। गिल्बर्ट (1977) और उन्हें रासायनिक अनुक्रमण कहा जाता है, जो इसे टुकड़ों में काटने के लिए डीएनए का इलाज करने के लिए रसायनों का उपयोग करता है। तापमान बढ़ाकर ssDNA को dsDNA dsDNA रेडियोधर्मी रूप से डीएनए के टुकड़े के 5 'छोर पर एक स्ट्रैंड को अनुक्रमित किया जाता है। रासायनिक प्रतिक्रियाओं का उपयोग करके विशिष्ट पदों पर डीएनए स्ट्रैंड्स क्लीव। जैसे, ए और जी, डाइमिथाइल सल्फेट (विषाक्त) दोनों के बाद डीएनए को तोड़ने के लिए फॉर्मिक एसिड (फायर एंट वेनोम), जी और टी के बाद टूटने के लिए, अलग -अलग आकारों के विभिन्न टुकड़ों के बाद सी और टी के बाद टूटने के लिए। तब टुकड़े को जेल वैद्युतकणसंचलन द्वारा अलग किया जा सकता है।

सेंगर विधि: 1977 में फ्रेडरिक सेंगर द्वारा आविष्कार किया गया था, और उन्हें 1980 में नोबेल पुरस्कार मिला। इसे चेन टर्मिनेशन या डाइडॉक्सी विधि भी कहा जाता है। Di deoxynucleotide ट्राइफॉस्फेट (DDNTP) चेन टर्मिनेशन में (राइबोस शुगर के 3'C पर H (आमतौर पर DNTP में पाया जाता है) और DDNTPS -elongation Step के SSDNA

जोड़)। तंत्र- SSDNA (पूरक स्ट्रैंड) enzymatic संश्लेषण के पूरक पोलिन्यूक्लियोटाइड के विशिष्ट न्यूक्लियोटाइड स्थिति पर जेल/केशिका इलेक्ट्रोफोरेसिस डीएनए अनुक्रम के बीच separated

स्वचालित अनुक्रमण: मानक प्रक्रिया से दो उल्लेखनीय अंतर के साथ, सेंगर-कूलसन विधि के आधार पर। स्वचालित पीसीआर के उत्पाद की लेबलिंग मानक प्रक्रिया में उपयोग किए जाने वाले रेडियोधर्मी लेबलिंग के स्थान पर फ्लोरोसेंट लेबल का उपयोग करती है। फ्लोरोसेंट लेबल - आमतौर पर चार डाइडॉक्सिन्यूक्लियोटाइड्स से जुड़ा हुआ है। चार-ट्रैक प्रणाली में। स्वचालित डीएनए अनुक्रमण में, चार डाइडॉक्सिन्यूक्लियोटाइड्स में से प्रत्येक का उपयोग एक अलग प्रतिक्रिया में किया जाता है, और उत्पादों को जेल के 4 आसन्न लेन में चलाया जाता है। अलग -अलग फ्लोरोक्रोम्स चार डाइडॉक्सिन्यूक्लियोटाइड्स में से प्रत्येक से जुड़े होते हैं (उनमें से सभी का उपयोग प्रत्येक डाइडॉक्सिन्यूक्लियोटाइड के लिए एक अलग प्रतिक्रिया तैयार करने के स्थान पर एक ही प्रतिक्रिया में किया जाता है); सिंगल-ट्रैक सिस्टम रिएक्शन उत्पाद एक एकल जेल लेन या केशिका में चलाए जाते हैं। थर्मल चक्र अनुक्रमण में डीएनए/सीक्वेंसिंग के लिए आवश्यक श्रृंखला-समाप्ति पोलिन्यूक्लियोटाइड उत्पन्न करें

डीएनए अनुक्रमण का आवेदन

1। फोरेंसिक

2। कृषि

3। दवा