DNA SEQUENCING
CHEMICAL METHOD AND ENZYMATIC METHOD

هي العملية الي فيها الي بنشيك فيها اذا حصلنا ال sequenceصح قبل ما نبلش بعملية التصنيع للهرمونات ويطلع كل شغلنا غلط وتروح كل التكلفة على اشي فاضي

DNA SEQUENCING

- The process of determining the **order** of bases adenine (A), thymine (T), cytosine (C), and guanine (G) along a DNA strand.
- All the information required for the growth and development of an organism is encoded in the DNA of its genome.
- So, DNA sequencing is fundamental to

genome analysis and understanding the biological processes in general.

- هي الاساس لعملية صناعة recombinant dnaويعملوا expression for biological drug's

ومهمة مشان يكتشفوا كل الجينات المسؤولة عن الأمراض وحكينا انه بنسويها بعد ال pcrمشان نعرف انه هو الجين الي بدنا اياه ولا جين جديد قد يكون لمرض

TECHNICAL BREAKTHROUGH FOR DNA SEQUENCING

- In 1977, two separate methods for the large-scale sequencing of DNA were Included:
  - Chemical cleavage method by Maxam and Gilber
  - Enzymatic chain termination method by Sanger
- Of these two methods, Sanger method is more popular. Without changing the underlying concept of both methods, some improvements have been done over the years by applying different strategies, by developing various modifications and by automation.
- صار في عنا اجهزة زي الcabillary electroforesis sequencerهذا كان ثورة في هذا المجال كانو قبل يجيبو اربع تيوبات وبتحط الخلطة تبعتك وبتضيف عليها اشي واحد مختلف وبعدين بحطها بال pcrوبعدين بحطها على الجيل وبنعمل sequencingهالجهاز هسة باستخدام هالجهاز بنعمل الخلطة و edmbالي راح نحكي عنها كمان شوي كلها بتكون flueriсantly linkedوبكون فيه detecterبعمل detectionالهم كلهم وبترجمهم كلهم على الكمبيوتر فش اسهل من هيك يعني

TECHNICAL BREAKTHROUGH FOR DNA SEQUENCING

- As a result, a very large scale sequencing has become feasible, e.g. *E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, Human Genome Project etc.

- بال ۲۰۰۵ کان ال human genome کله معموله sequencing بشکل کامل

CHEMICAL CLEAVAGE METHOD

- This method uses double-stranded DNA samples. لازم يكون فيه كمية منيحة
- Involves modification of the bases in DNA by controlled chemical reaction- followed by chemical base-specific cleavage.
- بعد التفاعل بصير في عنا cleavage على مناطق معينة وبعدين بنمشي القطع على الجل وبكون الها احجام معينة بالسلايد الي ورا راح نوضح اكثر
- Sequences DNA fragments containing up to ~500 nucleotides in length.

STAGES:

1. The double-stranded fragment to be sequenced is isolated and radioactively labeled at the 5'-ends with ^{32}P.

أول اشي بينعمله يا جماعة بنجيب double standard dna
بنعمل de phosphorylationبعدين بنرد نعمله
وكلهphosphorylation by radioactive substance
بكون على الfive prime

2. The fragment is then cut with restriction enzyme and thus the label is removed from one end.

بعدين بنقص الdnaتبعنا لtwo strandباستخدام restriction
enzymes

3. The fragment of DNA with one end labeled is denatured.

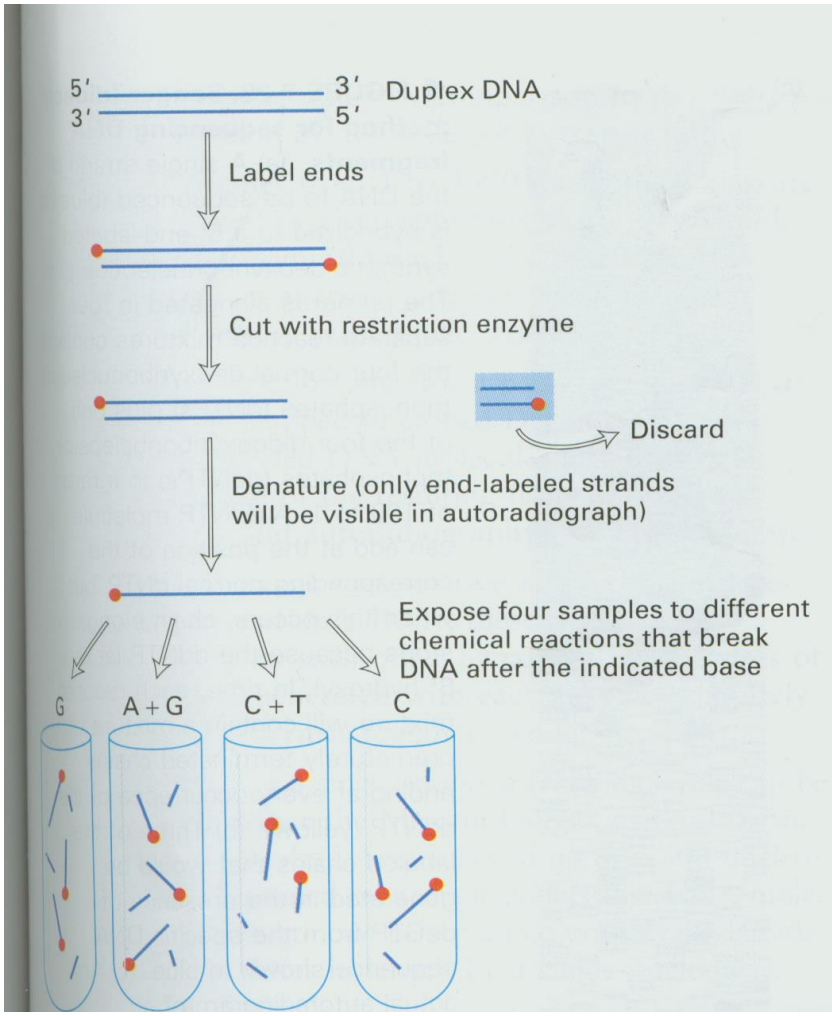
وبعدين باخذ وحدة من الstrandsوبنقسمها لاربع قطع متساوية
وبحط طل وحدة فيها بtest tube

4. Four identical samples of these end-labeled DNA restriction fragments are subjected to chemical

cleavage at different chemical nucleotides.

بعدين بضيف على كل تيوبreagentمختلف

اقلب السلايد --



STAGES:

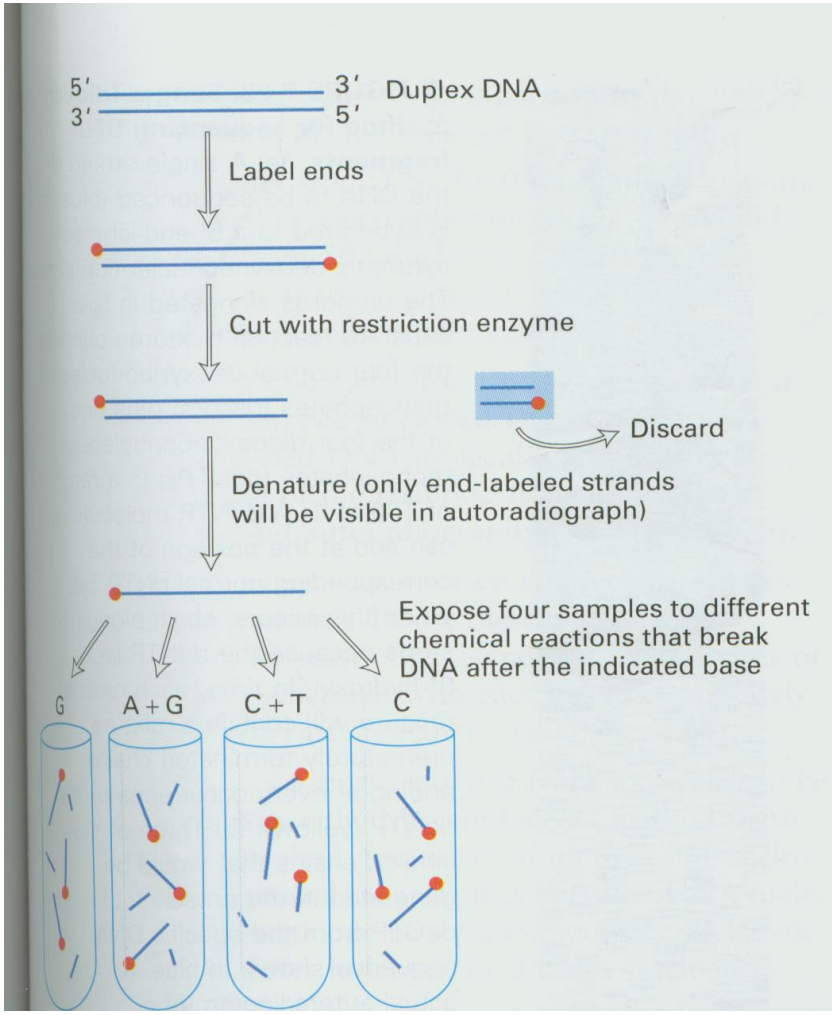
cleavage at different chemical nucleotides.

5. There are four specific sets of chemical reactions that selectively cut the DNA backbone at G, A+G, C+T, or C residues.

- G only: Dimethyl sulphate(DMS) and piperidine
- A+G : DMS,and formamide piperidine

هسة لما نضيف ال formamide صار يقطع عنا بعد ال G او بعد ال A لما كان بدون formamide كان يقطع بس بعد ال G

- C+T : Hydrazine, piperidine
- C only : Hydrazine, alkali or NaCl piperidine



6. For each labeled chain to be broken only once, the reactions are controlled.

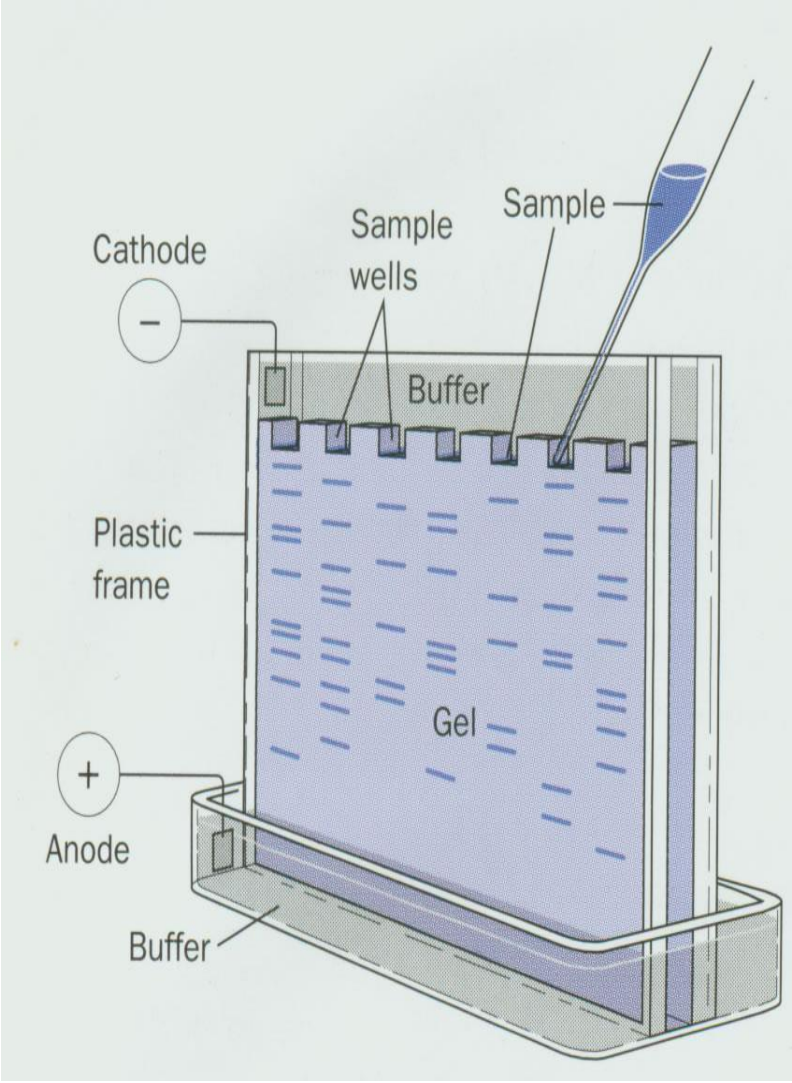
لازم يكون controlled لانه اذا منطول عليه بصير يقص كل اشي

7. The labeled subfragments created by the four reactions have

- the ^{32}P label at one end and
- the chemical cleavage point at the other end.

8. The reaction products are separated by polyacrylamide gel electrophoresis which is based on size. Smallest fragment goes fastest.

ما بزبط ال agarose لانه الاحجام للقطع كثير صغيرة فالتفريق بينهم صعب بال agarose

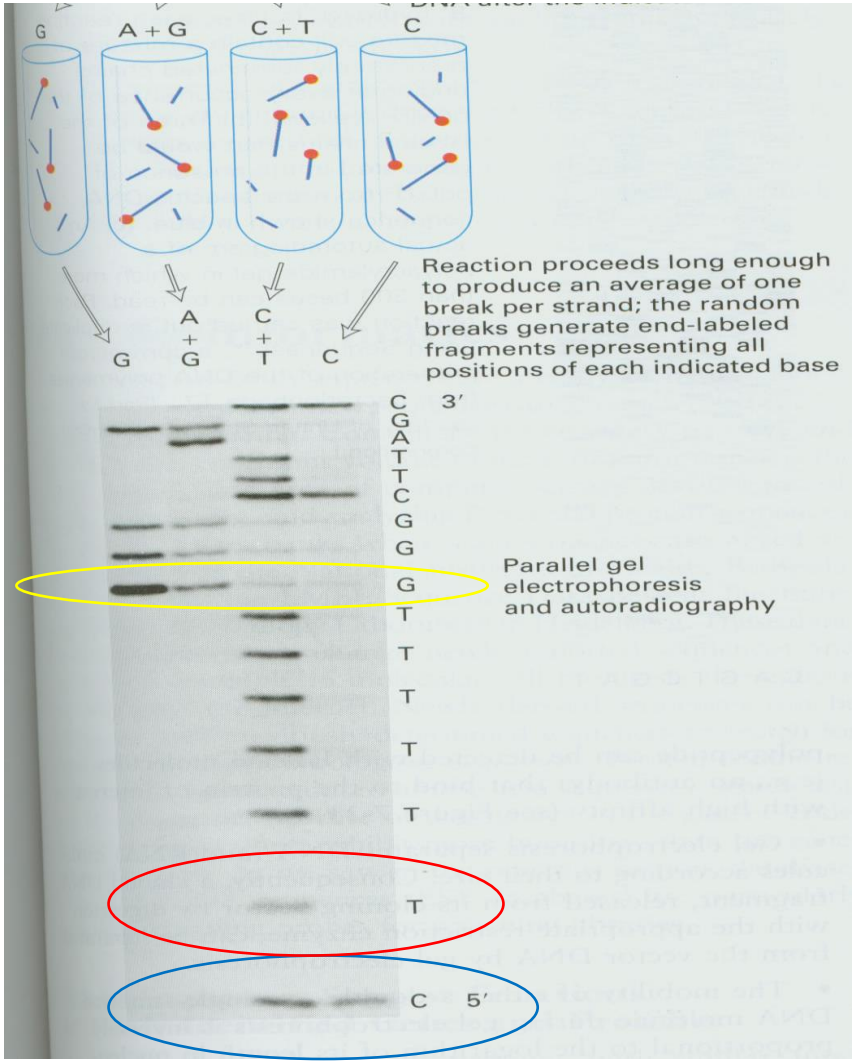


9. The labeled fragments in the gel are visualized by autoradiography (x-ray).

10. The sequence is read from bottom to top of the gel.

بنبلش قرائة من اتجاه ال five primeالي بكون من الأسفل للأعلى

هسة بعد ما خلصنا العمليات كلها نيجي نقرأ من فوق مقسملنا اياها حسب الانزيمات الي قطعنا فيها وهي الي راح تيجينا في الامتحان ومن جنب هو ال sequenceالي بدنا نقرأه وهوالمطلوب بالامتحان بنبلش من تحت زي ما حكينا اول وحدة الي عليها دائرة زرقا هي cلانه موجودة عند الانزيم الي بقطع عند ال c طيب الي فوقها الي في الدائرة الحمرة هي الي فيها التريك موجودة عند الانزيم الي بقطع عند ال C or Tطب كيف نميز انها c or Tبطلع جمبها عند الانزيم الي بقطع cبس اذا مش موجودة زي ما هو عنا هون بتكون مش cفطالما هي مش cراح تكون tاكيد فش خيارات ثانية بنكمل قرائة بالترتيب نيجي لفوق لحد الدا ئرة الصفرا هو Gor Aبتفرج على الانزيم الي بقطع G موجودة معناته هي Gوهيك بنضل ماشيين من تحت لفوق بالترتيب لغاية ما نطلع الsequence



EXAMPLE OF DNA SEQUENCING BY CHEMICAL METHOD

هذا تمرين على القرائة غطو ال sequenceواختبروا حالكم

CHEMICAL CLEAVAGE OF A DNA SAMPLE AT C BASES

End-labelled DNA sample

^{32}P-A-p-T-p-T-p-G-p-C-p-G-p-C-p-T-p-G-p-C-p-A-p-C-p-G-p-C-p-T

^{32}P _____

^{32}P _____

^{32}P _____

^{32}P _____

^{32}P _____

End-labelled DNA fragments

AUTORADIOGRAM OF SAMPLE
MAXAM-GILBERT SEQUENCING GEL

G	A+G	C+T	C	SEQUENCE (END)
		—	—	C (3')
—	—			G
	—			A
		—		T
		—		T
		—		T
		—	—	C
—	—			G
—	—			G
	—			A
		—		T
		—	—	C
	—			A
	—			A (5')

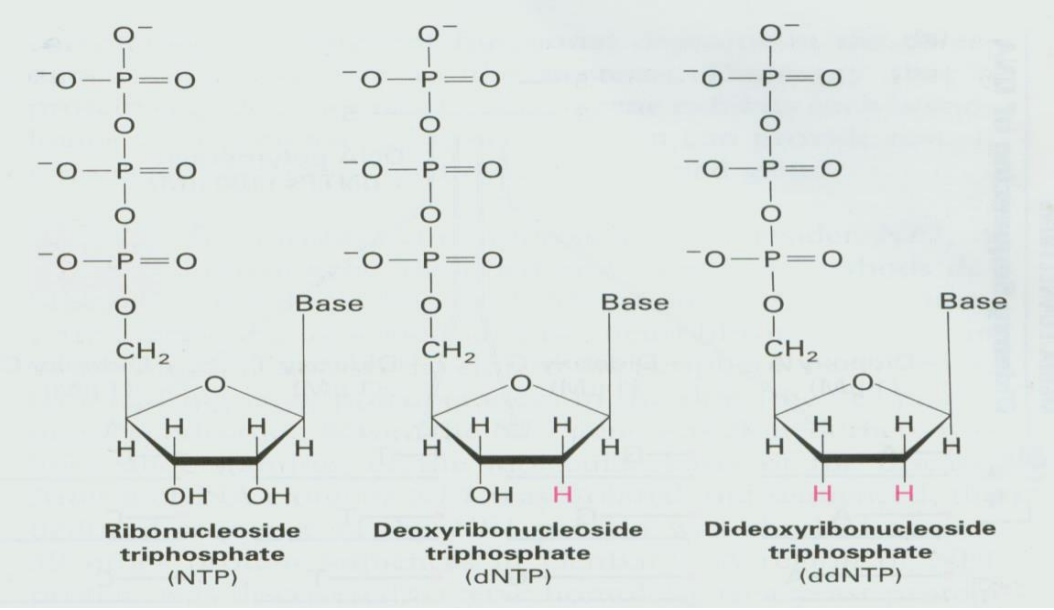
ADVANTAGES AND DISADVANTAGES

- No premature termination due to DNA sequencing. So, no problem with polymerase to synthesize DNA.
- Stretches of DNA can be sequenced which can not be done with enzymatic method.

- Not widely used.
- Use of radioactivity and toxic chemicals.

CHAIN TERMINATION METHOD

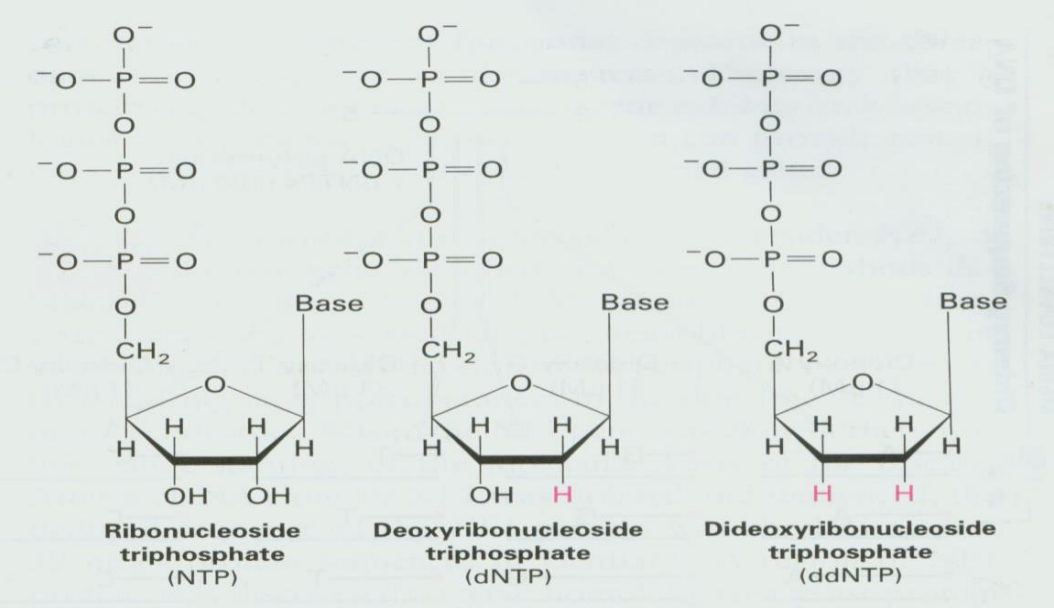
- This method uses single-stranded DNA. More widely used
- Also known as **dideoxy sequencing** method because it involves the use of analogue of normal nucleotide 2',3'-dideoxynucleoside triphosphates (ddNTPs). These are chain terminating nucleotides lacking 3'-OH ends.
- This method is based upon the incorporation of ddNTPs into a growing DNA strand to stop chain elongation.
- بنضيف ال ddNTP لنوقف ال sequencing بمكان محدد



Structure of NTP, dNTP, and ddNTP

CHAIN TERMINATION METHOD

- This method uses single-stranded DNA. More widely used
  - ال NTPهو ribose sugarكامل مش رايح منه ولا ohوبرتبط معه baseو tri phosphate
  - ال dNTPبفرق عن الي قبله ال ohعلى ال two primeرايحةمشان هيك بنسميه deoxy
  - ال ddNTPال ohال على ال three nad four primeمش موجودين وظيفتها بتوقف ال chain elongationفمثلا مقابل ال c nucleotideبركب ddGTP ومقابل ال Aبركب ddTTBوبعمله terminationعملية ايقاف للelongation

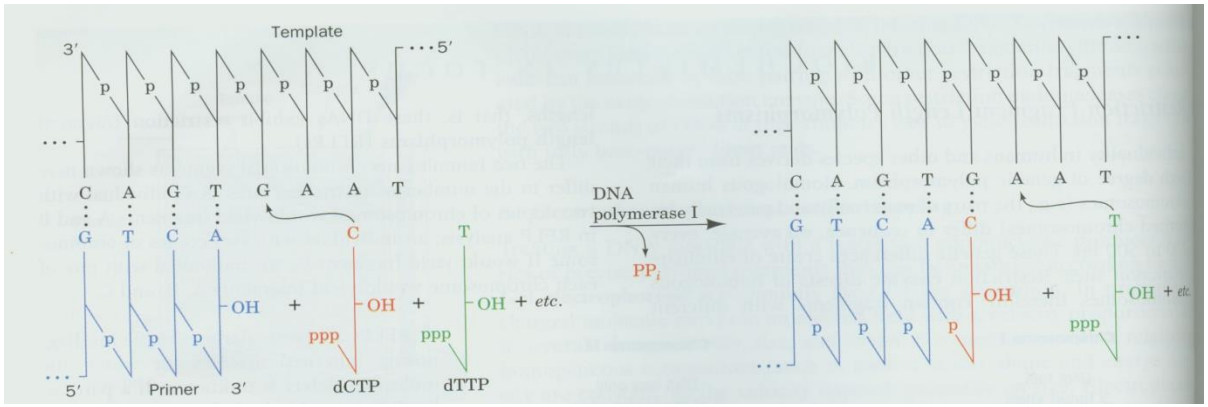


Structure of NTP, dNTP, and ddNTP

STAGES:

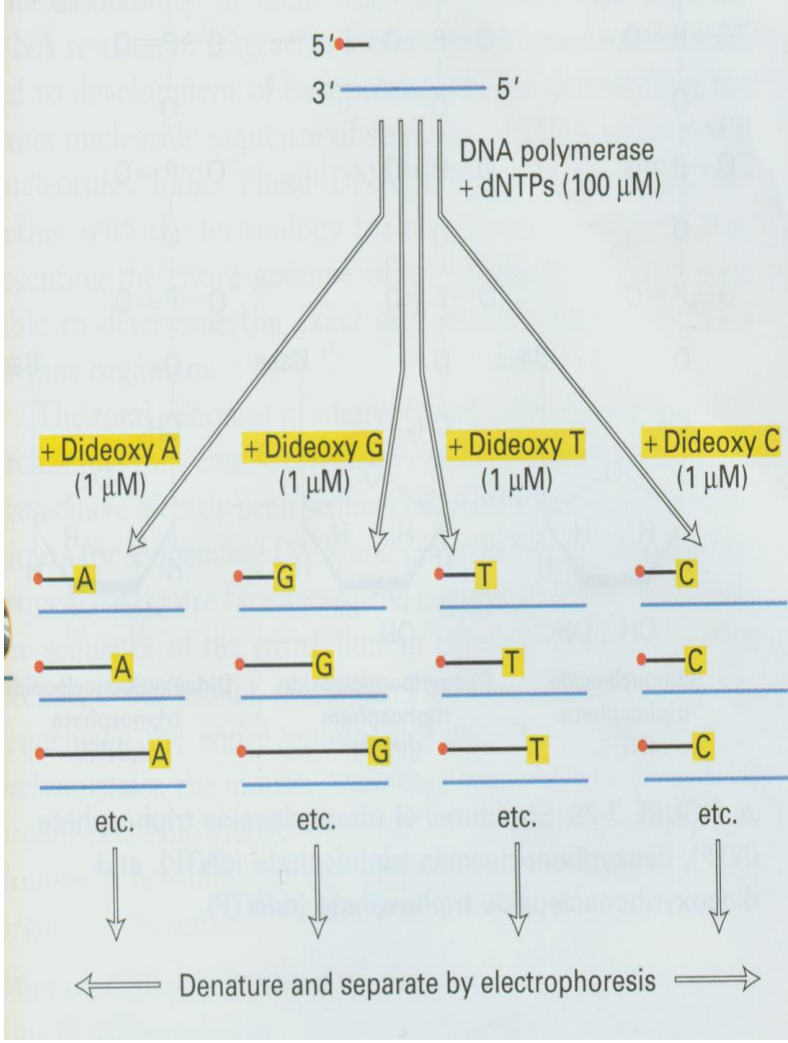
1. The DNA to be sequenced is extracted from phage or E. coli for sequencing purpose.
2. A synthetic 5'-end-labeled oligodeoxynucleotide is used as the primer.
3. The template DNA is hybridized to the primer.
4. The primer elongation is performed in four separate polymerization reaction mixtures. Each mixture contains
   - 4 normal deoxynucleotides (dNTPs) in higher concentration and
   - a low concentration of the each of the 4 ddNTPs.
5. There is initiation of DNA synthesis by adding enzyme DNA polymerase since the enzyme cannot distinguish between the normal nucleotides and their analogues.

مبدأها قريب من ال pcr بنجيب اربعة test tube وبنحط فيهم dNTP بكمية كبيرة وبنحط واحد من ddgtp nucleotide وين راح يوقف عند اي tube في كل واحد فيهم فبنكون عارفين كل ddatp,ddctp,ddttp فمثلاً ال tube الي فيه ddgtp راح يصنع كل القطع الي فيها c وبتوقف عندها وبنحط بعدين كل القطع الي طلعت معنا في الجيل وبفصلها حسب الحجم وبنقرأها من تحت لفوق



Action of DNA polymerase I

6. The strand synthesis continues until a ddNTP is added. The chain elongation ceases on the incorporation of a ddNTP because it lacks a 3'-OH group which prevents addition of the next nucleotide.
7. There is a result of mixture of terminated fragments, all of different lengths.
8. Denature DNA fragments.
9. Each of the four mixtures are run together on a polyacrylamide gel for electrophoresis.

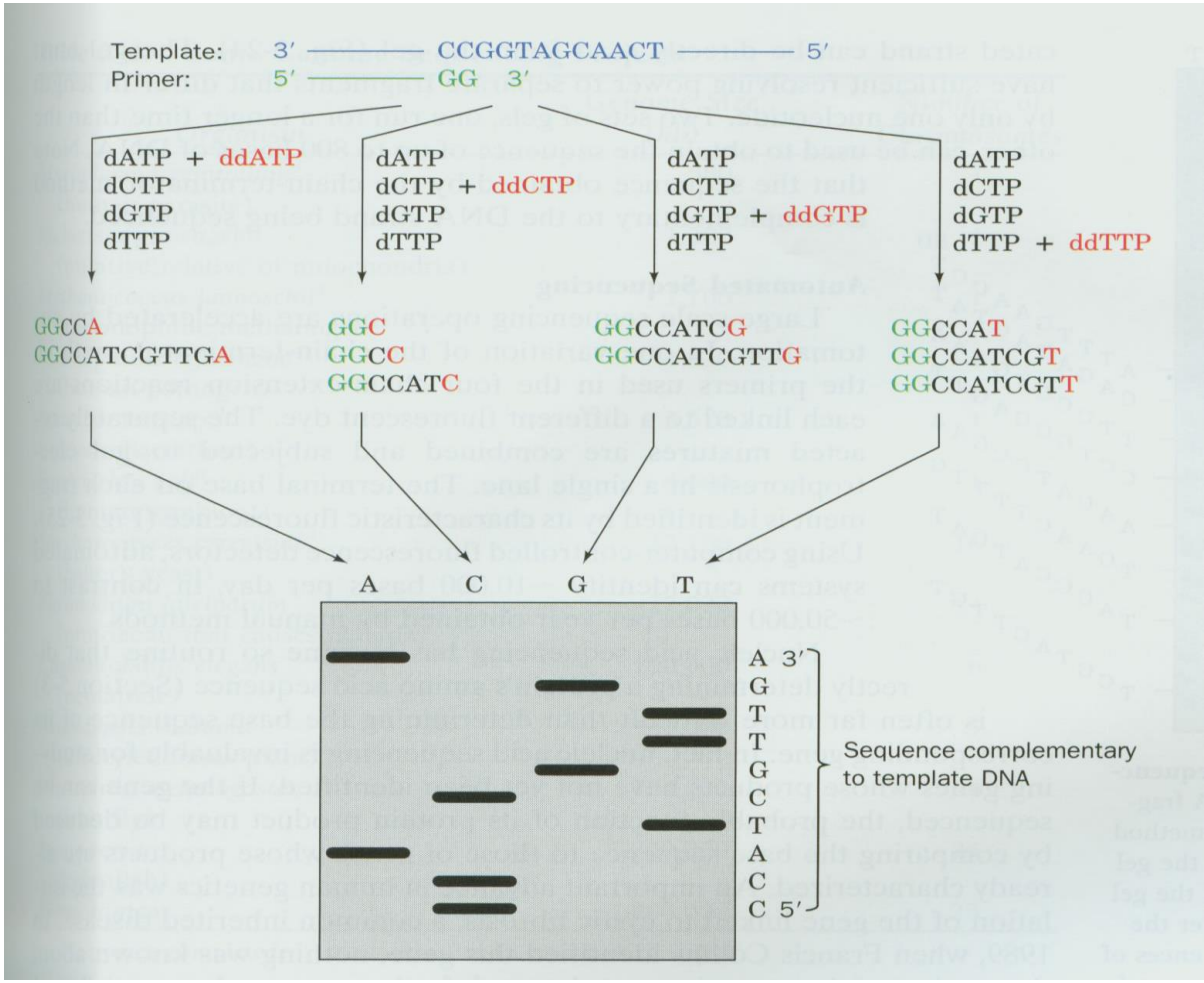


Sanger method

10. The separated fragments are

then visualized by autography.

11. From the position of the bands of the resulting autoradiogram, the sequence of the original DNA template strand can be read directly.



Chain termination method