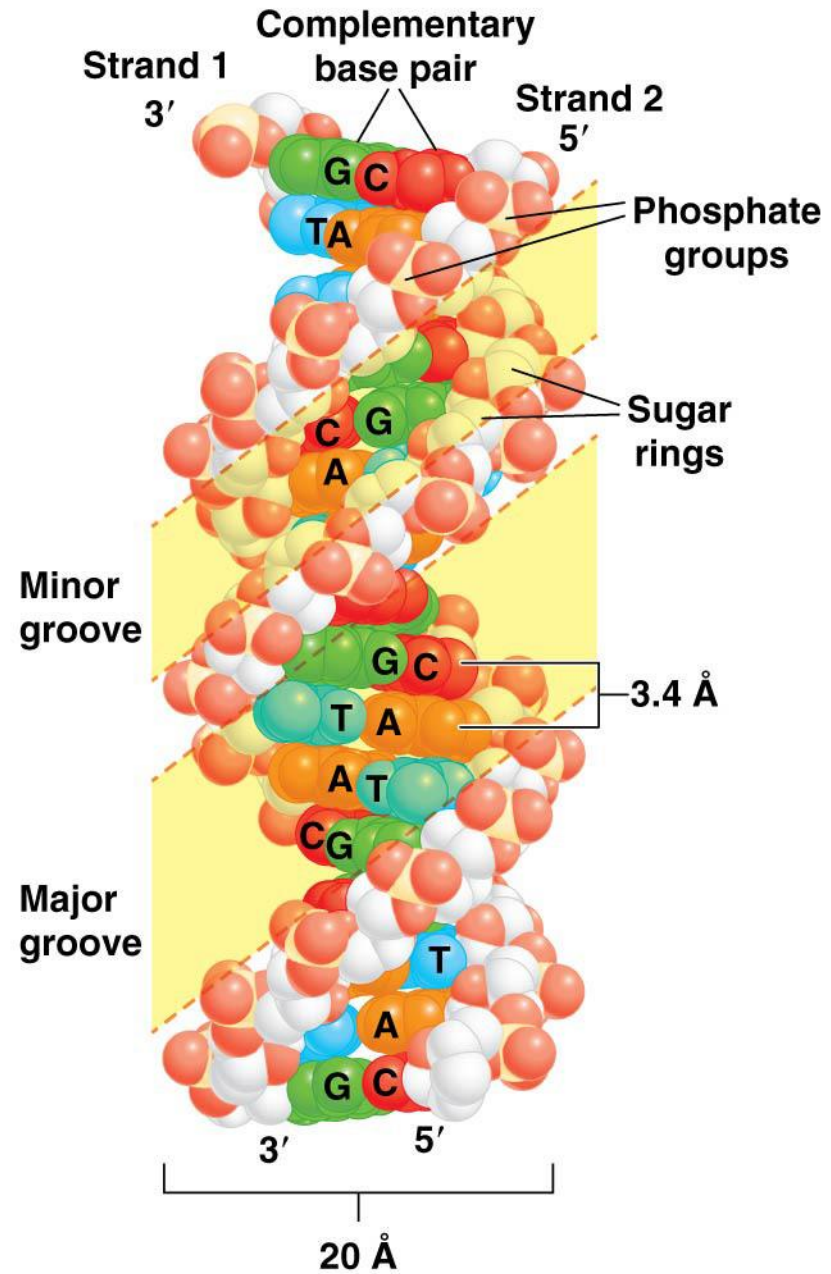


(b) Space-filling diagram



ADN – CROMOSOMAS – REPLICACIÓN

Objetivos

Describir la composición y estructura de los ácidos nucleicos (AND, RNA).

Distinguir entre los diferentes tipos de ácidos nucleicos y su organización en los cromosomas y cómo la configuración de los cromosomas varía entre grupos biológicos como los virus, las bacterias y los eucariotas.

Describir el mecanismo de replicación del ADN y el rol de las proteínas y enzimas que intervienen en el proceso.

Usar el conocimiento de la replicación en la solución de problemas (antibióticos, casos de importancia social).

Conocer e interpretar resultados que se obtienen con algunas técnicas de análisis molecular que utilizan como base la replicación del ADN.

Características del material hereditario

Está localizado en el núcleo (eucariotas) y es el componente principal de los cromosomas.

Está presente de forma estable en el interior de las células.

Es lo suficientemente complejo como para contener la información necesaria para garantizar la estructura, función, desarrollo y reproducción de los organismos.

Tiene la capacidad para replicarse de forma precisa de forma tal que las células hijas contienen la misma información que las células progenitoras.

Variable, experimenta una tasa baja de mutaciones que introduce variación genética y sirve de base para el cambio evolutivo.

Identificación del ADN como material hereditario

El ADN fue reconocido por primera vez cuando Friedrich Meischer, en 1869, lo aisló por primera vez del núcleo de los glóbulos blancos de la sangre. Lo llamó “nucleína”.

En los 1870s, estudios a nivel microscópico permitieron la visualización de la fusión de los núcleos femeninos y masculinos durante la reproducción. Los cromosomas fueron observados poco tiempo después.

En 1952, Hershey y Chase mostraron que el ADN era el responsable de la infección de los bacteriófagos a las células bacterianas.

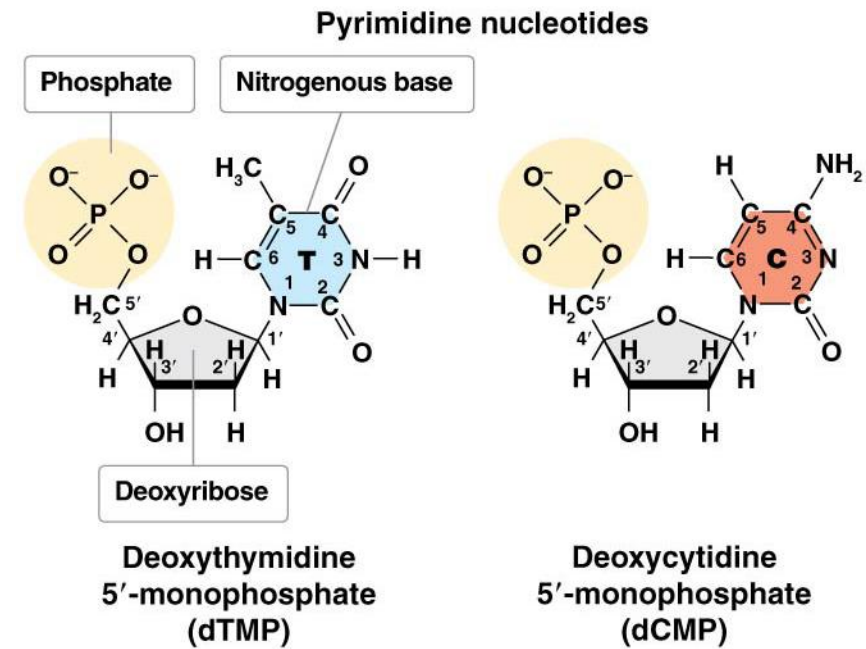
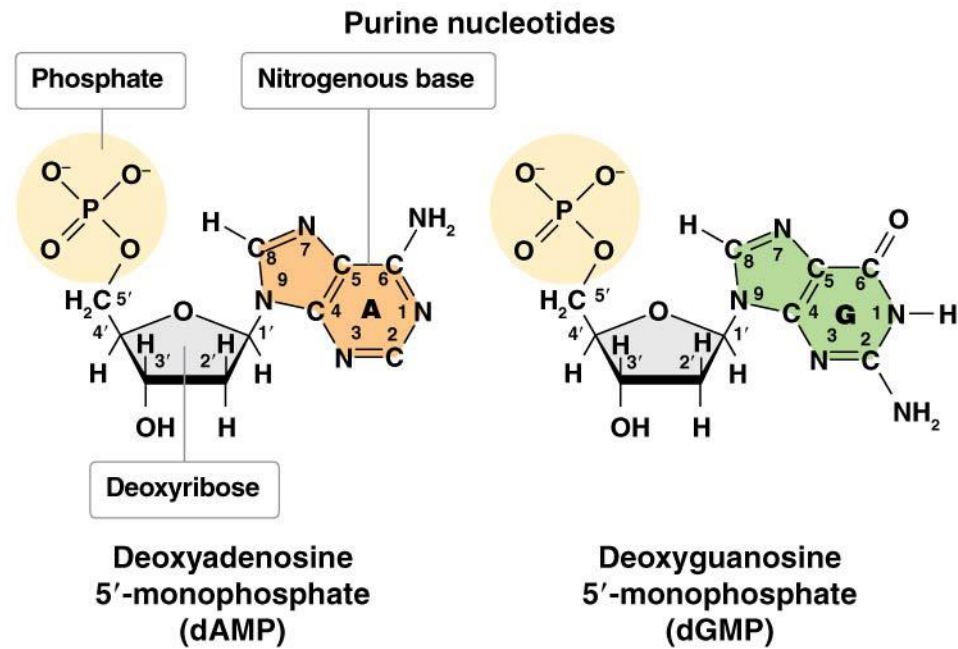
Estructura de la molécula de ADN

El modelo de Watson y Crick de la estructura secundaria del ADN muestra que es una molécula relativamente simple.

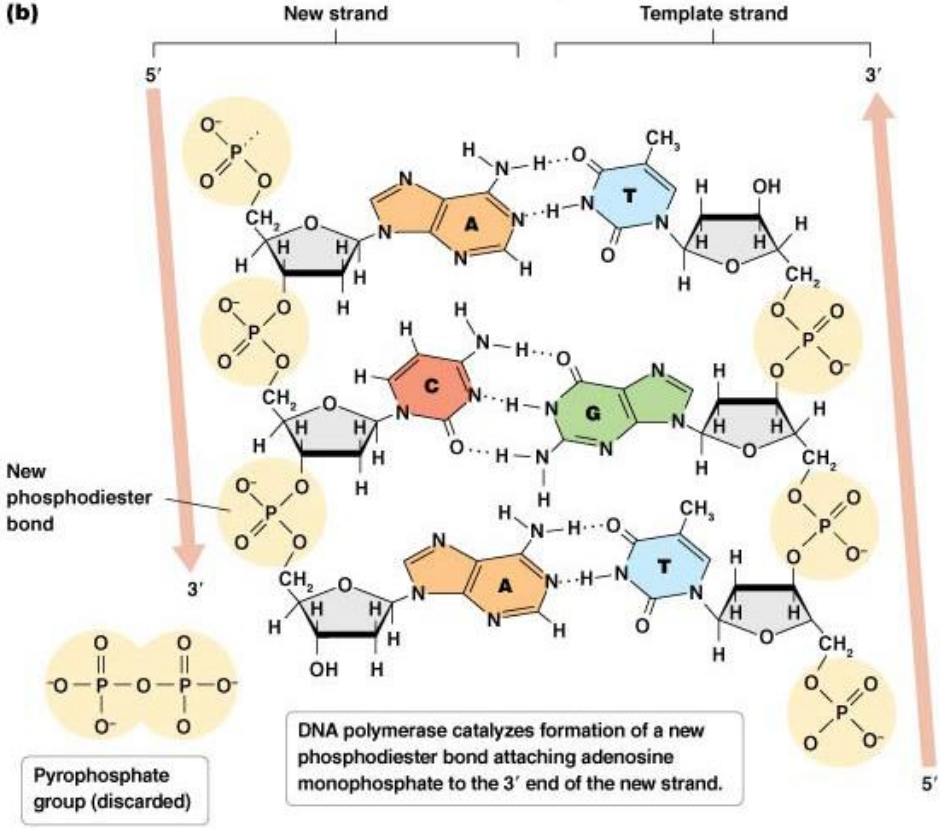
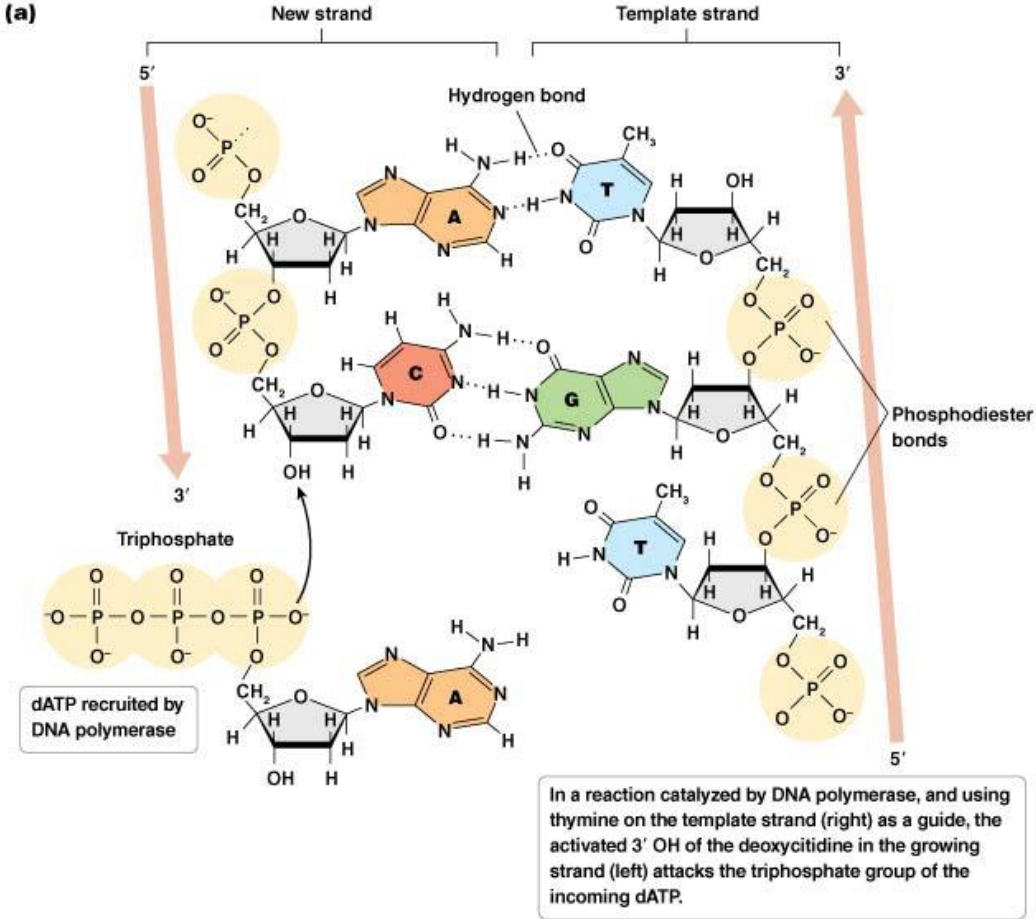
Está compuesta por cuatro tipos de nucleótidos, unidos por enlaces covalentes fosfodiéster, con dos hebras de polinucleótidos que se presentan unidas formando una doble hélice.

A pesar de su estructura relativamente simple, el ADN es una molécula compleja desde el punto de vista informativo.

Componentes y estructuras de los nucleótidos monofosfatos del ADN



Elongación de la hebra de ADN

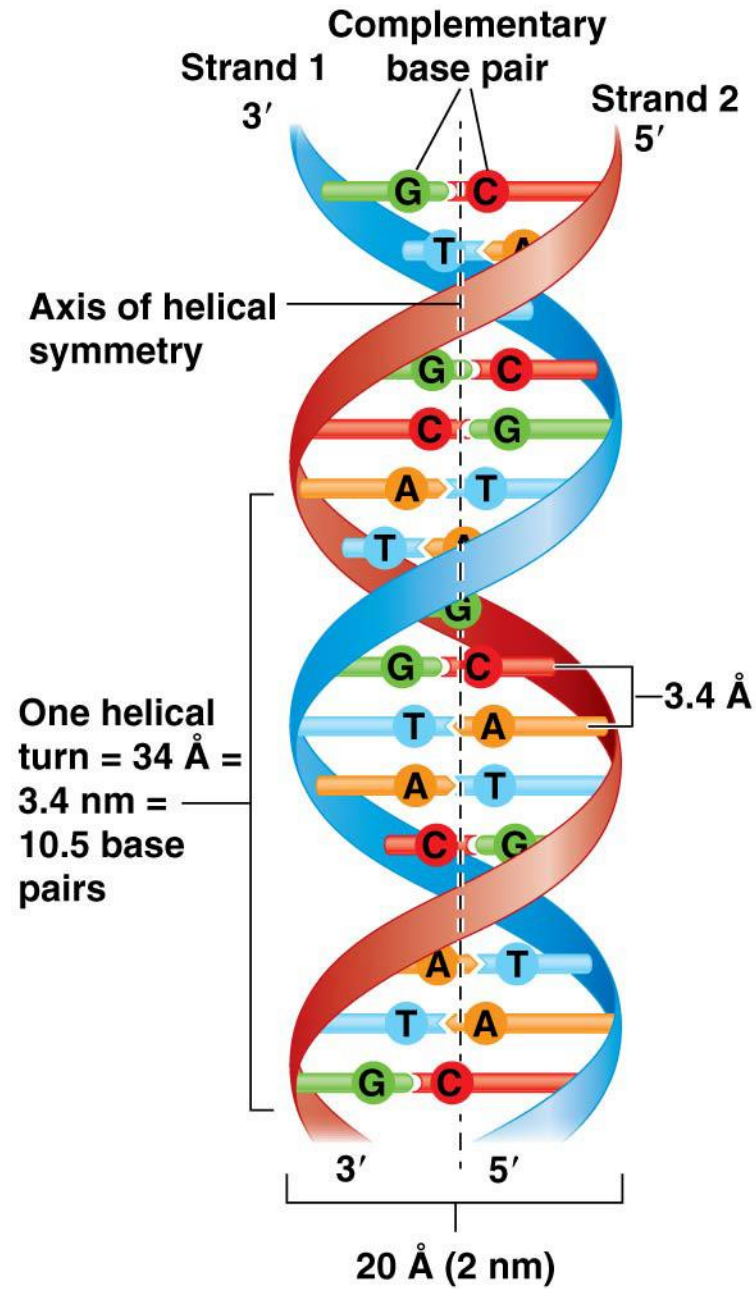


Pareo de los nucleótidos complementarios

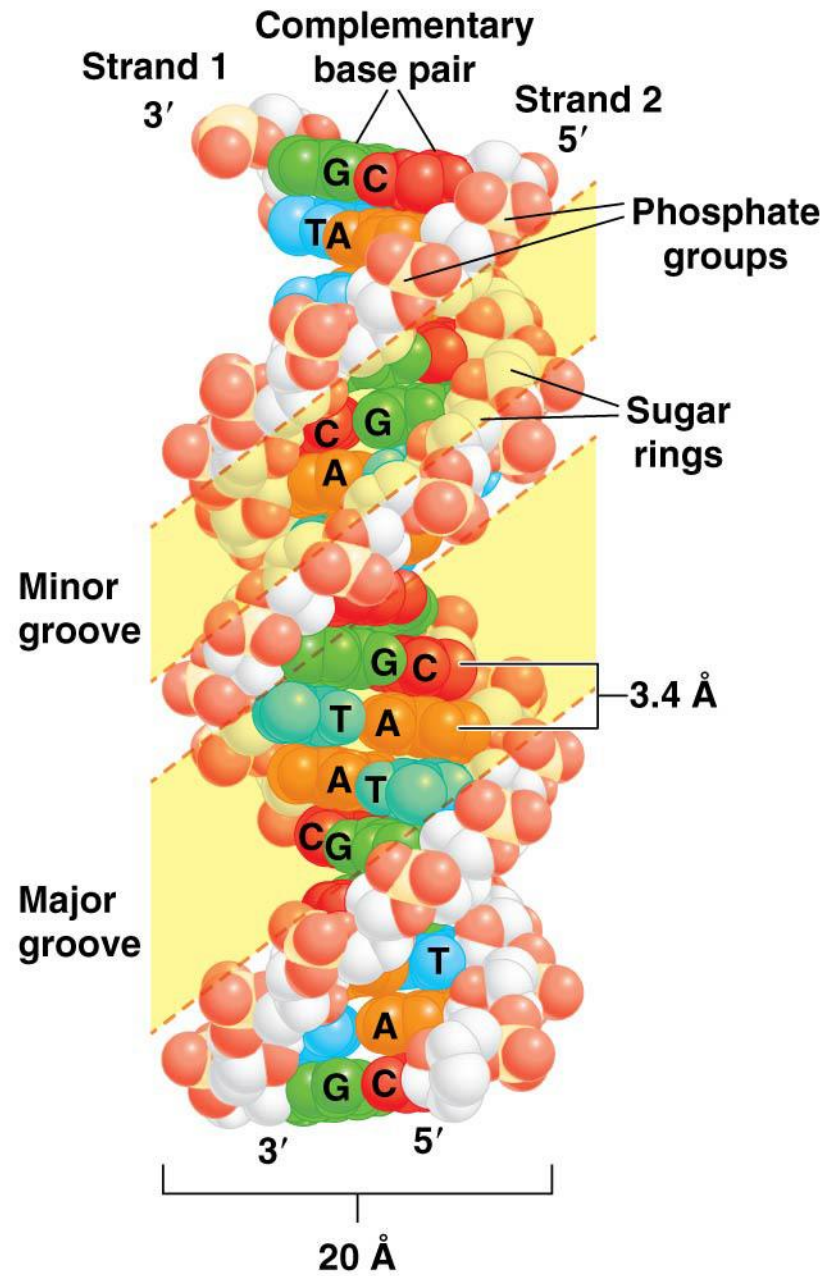
Las dos hebras de polinucleótidos de la doble hélice forman una estructura estable que sigue dos reglas:

1. Las bases de una hebra son **complementarias** a las bases de la otra hebra (A se parea con T y G se parea con C).
2. Las dos hebras son antiparalelas con respecto a sus extremos 5' y 3'.

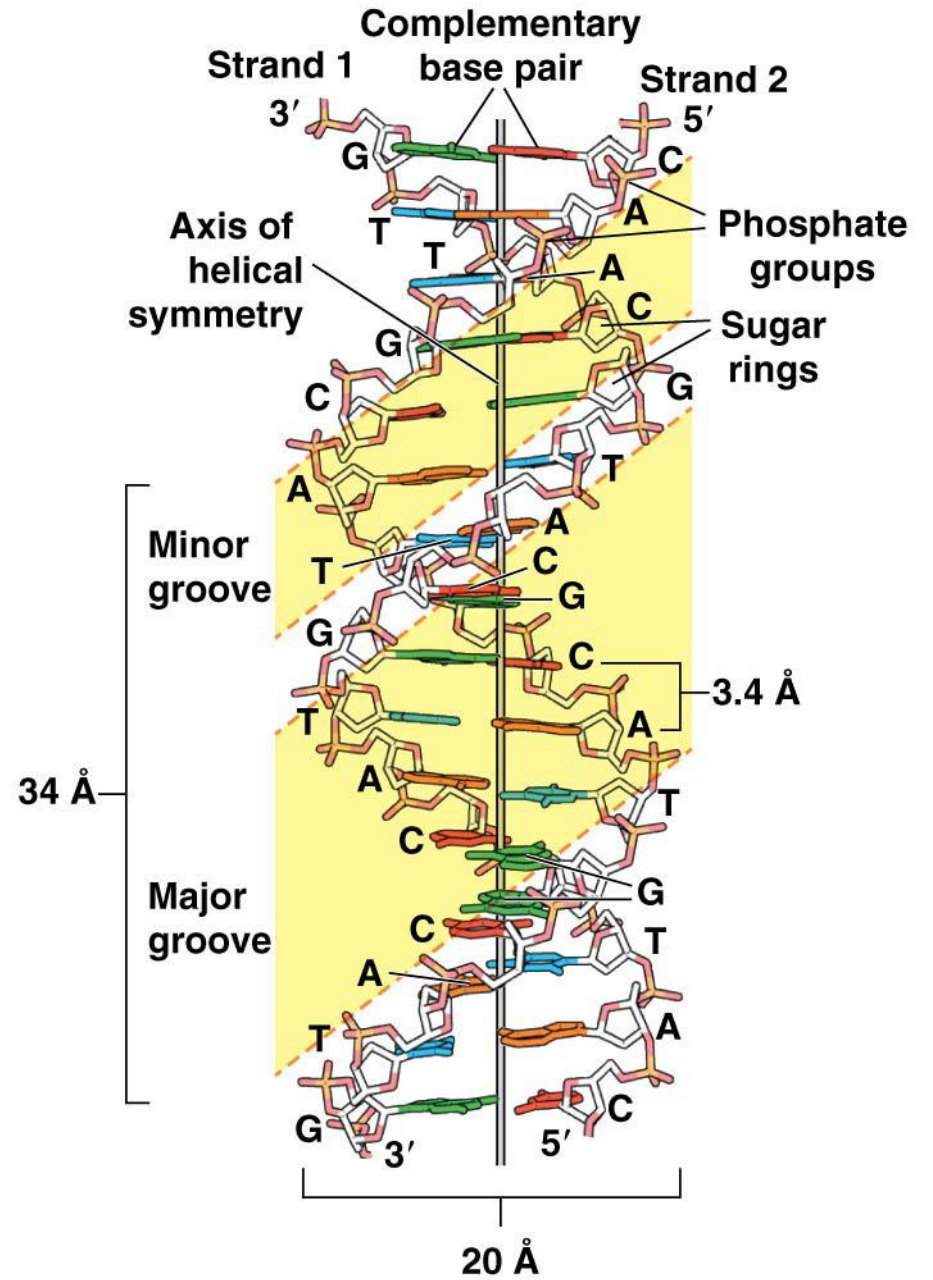
(a) Ribbon diagram



(b) Space-filling diagram



(c) Ball-and-stick diagram



Material hereditario en un virus

Un **virus** es una partícula infecciosa, no celular, con un genoma compuesto por un ácido nucleico pequeño que contiene unos pocos genes.

El ácido nucleico puede ser ADN de una o dos hebras, o ARN.

Un virus debe infectar una célula para replicarse y expresar su material genético usando las proteínas y ribosomas de la célula hospedera.

El genoma de los virus

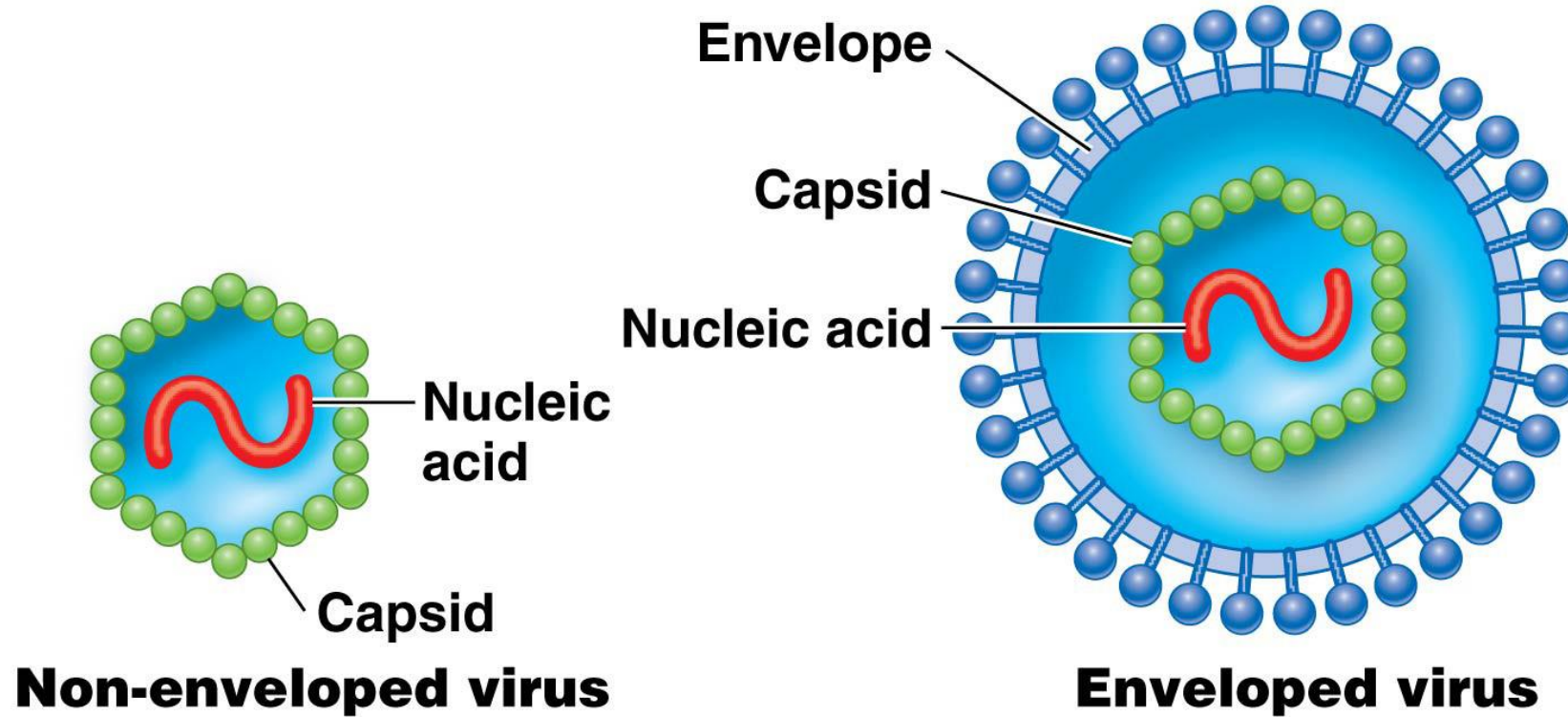
El contenido, la configuración estructural y el tamaño del genoma de los virus varía de un tipo a otro.

Los ácidos nucleicos en los virus no están asociados con proteínas.

El tamaño del genoma de los virus varía en tamaño de unas pocas miles de bases (o pares de bases) a un poco más de 200 000 bases (o bp).

El contenido varía de un mínimo de 5 genes hasta 300 genes.

Tipos de virus: sin envoltura y con envoltura



El genoma de las bacterias

La mayoría de las especies de bacterias tienen cromosomas circulares y contienen varios miles de genes empacados densamente en el cromosoma.

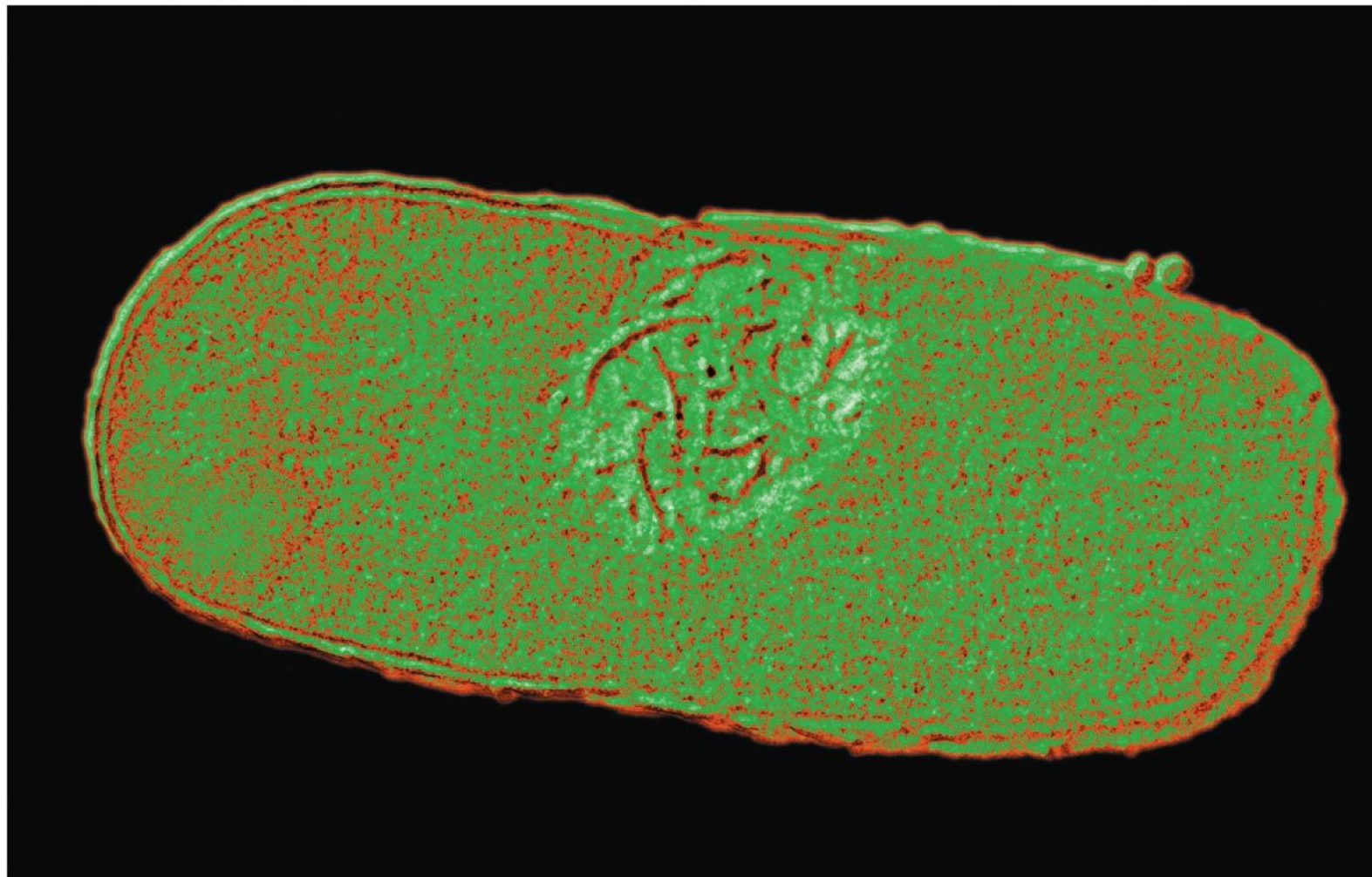
Los genes estructurales contienen secuencias de ADN que codifican para el funcionamiento normal y el metabolismo de las bacterias.

Existen regiones intergénicas que separan un gen de otro.

Table 11.2**Chromosome Diversity among Bacteria**

Species	Genome Size (in Mb)	Number of Chromosomes	Chromosome Form(s)
<i>Mycoplasma genitalium</i>	0.58	1	Circular
<i>Borrelia burgdorferi</i>	1.4	2	One circular, one linear
<i>Haemophilus influenzae</i>	1.83	1	Circular
<i>Vibrio cholerae</i>	4.0	2	Both circular
<i>Escherichia coli</i>	4.2	1	Circular
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	5.7	4	Three circular, one linear
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	6.7	3	All circular

Cromosoma compactado en el nucleoide de *E. coli*



Cromosoma bacteriano

El cromosoma bacteriano está **compactado** en dos formas:

1. Por la presencia de proteínas que organizan en ADN en lazos y empaquetan el cromosoma en el nucleóide.
2. El ADN circular experimenta un superenrollamiento.

Proteínas asociadas a los cromosomas

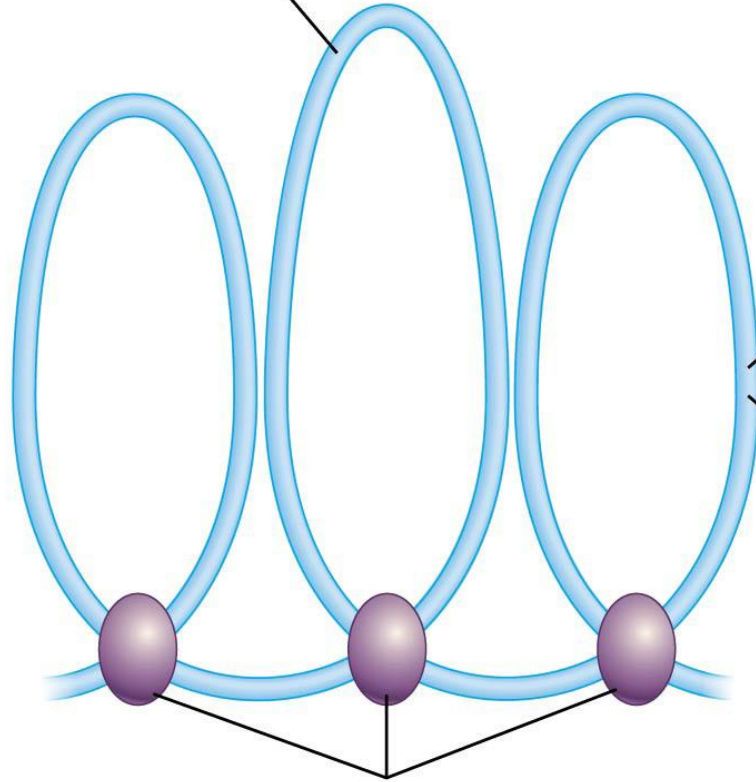
Las proteínas pequeñas asociadas al nucleoide participan en el arqueado del ADN que contribuye a su plegamiento y condensación en el cromosoma.

Las proteínas para el mantenimiento estructural del cromosoma (SMC) hacen que el ADN permanezca en rollos o con forma de V.

Existen otras proteínas que también interactúan en el nucleoide para compactar el ADN.

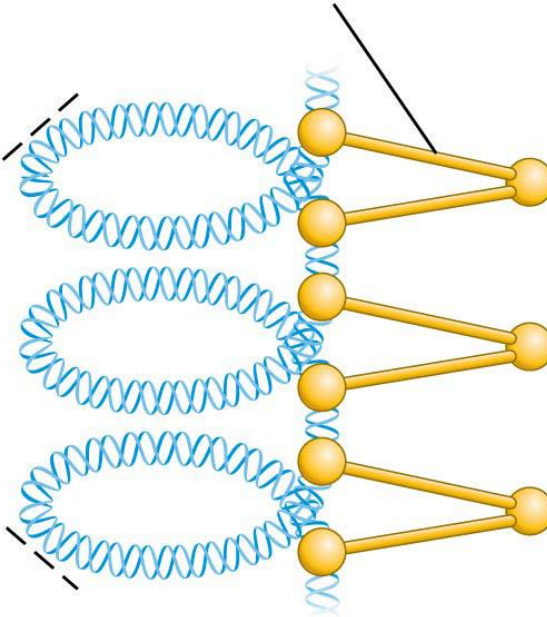
Condensación del cromosoma bacteriano por las proteínas

Average loop contains
~40 kb DNA



Loops secured at base
by HU and H-NS

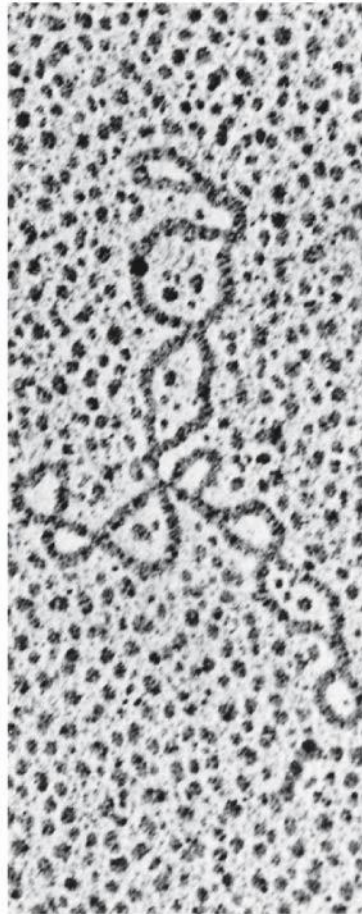
Smaller loops consisting
of duplex DNA condensed
by SMC proteins



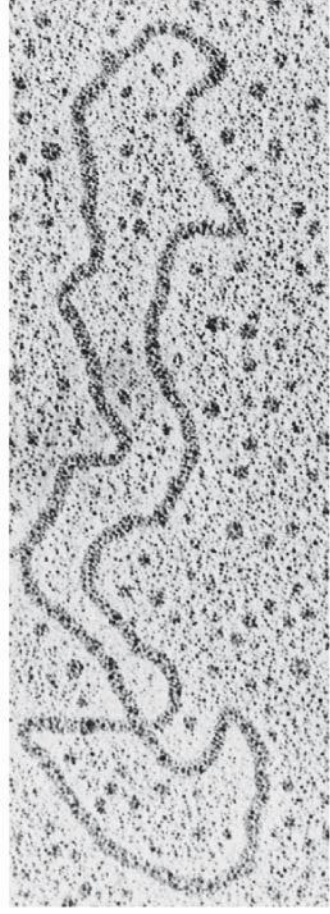
ADN circular con múltiples formas (niveles de relajación)

(a)

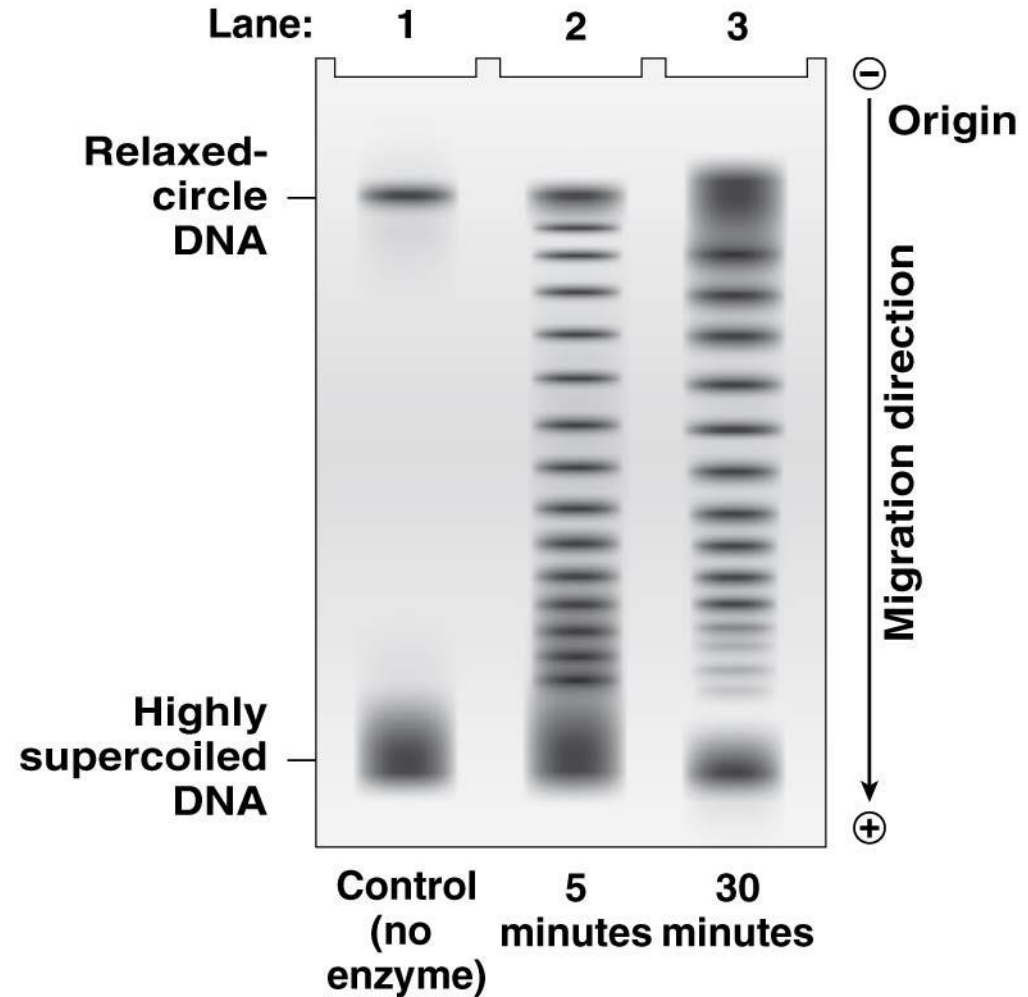
Supercoiled DNA



Relaxed-circle DNA



(b)



Cromosomas en Eucariotas

Los eucariotas poseen múltiples cromosomas que experimentan ciclos de condensación asociados a la división celular.

El genoma de eucariota tiene decenas de miles de veces el contenido de ADN que el de bacteria o arquea.

El ADN y las proteínas asociadas en el cromosoma eucariótico se conocen como cromatina.

Las proteínas que organizan el ADN en el cromosoma son esenciales pues proveen mecanismos para la condensación, segregación y organización de los cromosomas.

Proteínas histonas y el nucleosoma

En eucariotas, cada cromosoma es aproximadamente mitad ADN y mitad proteína.

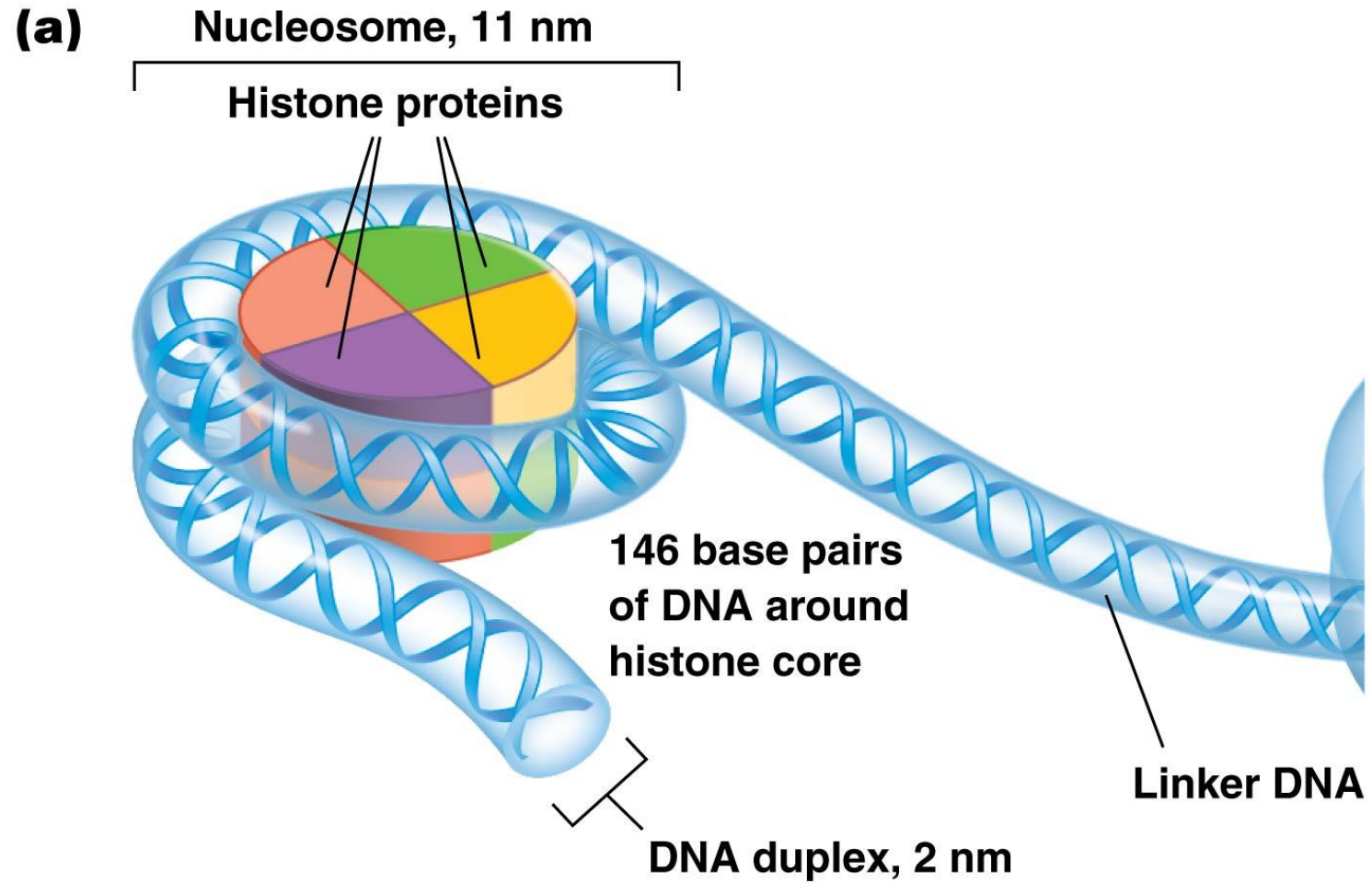
Cerca de la mitad de las proteínas son **histonas**, proteínas pequeñas y sencillas que unen estrechamente al ADN. Las proteínas restantes, las **no-histonas**, son muy diversas y realizan varias tareas en el núcleo.

Hay cinco tipos de histonas en la cromatina: **H1, H2A, H2B, H3 y H4**. Estas proteínas han permanecido muy conservadas en la evolución de los eucariotas.

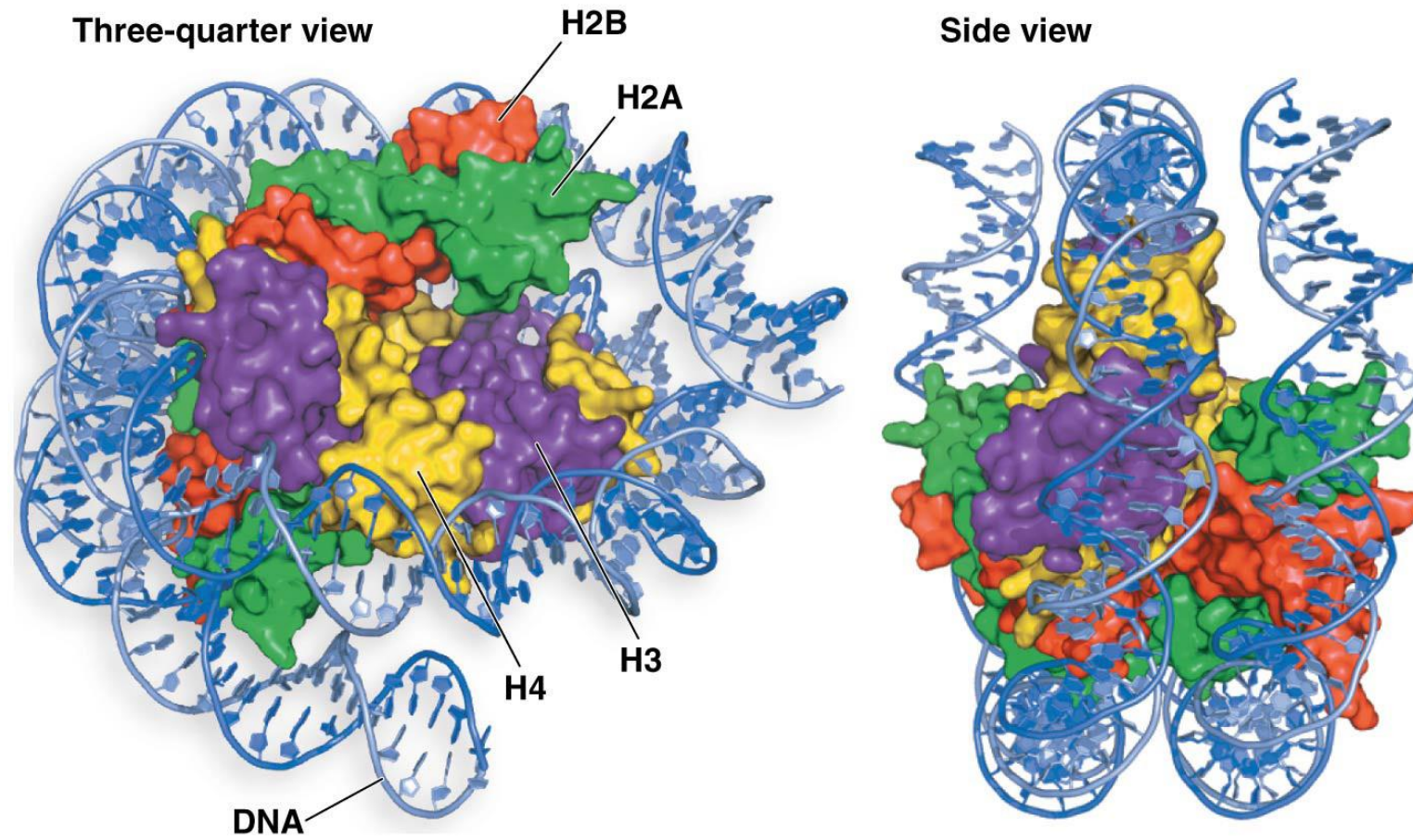
Las **partículas centrales (core)** del nucleosoma son unidades fundamentales de organización formadas por dos moléculas de **H2A, H2B, H3 y H4** (i.e., forman un octámero).

Una porción de ADN, con ~ 146 bp de largo (ADN central – **core DNA**) se envuelve alrededor de cada octámero para formar el **nucleosoma**.

Estructura del nucleosoma

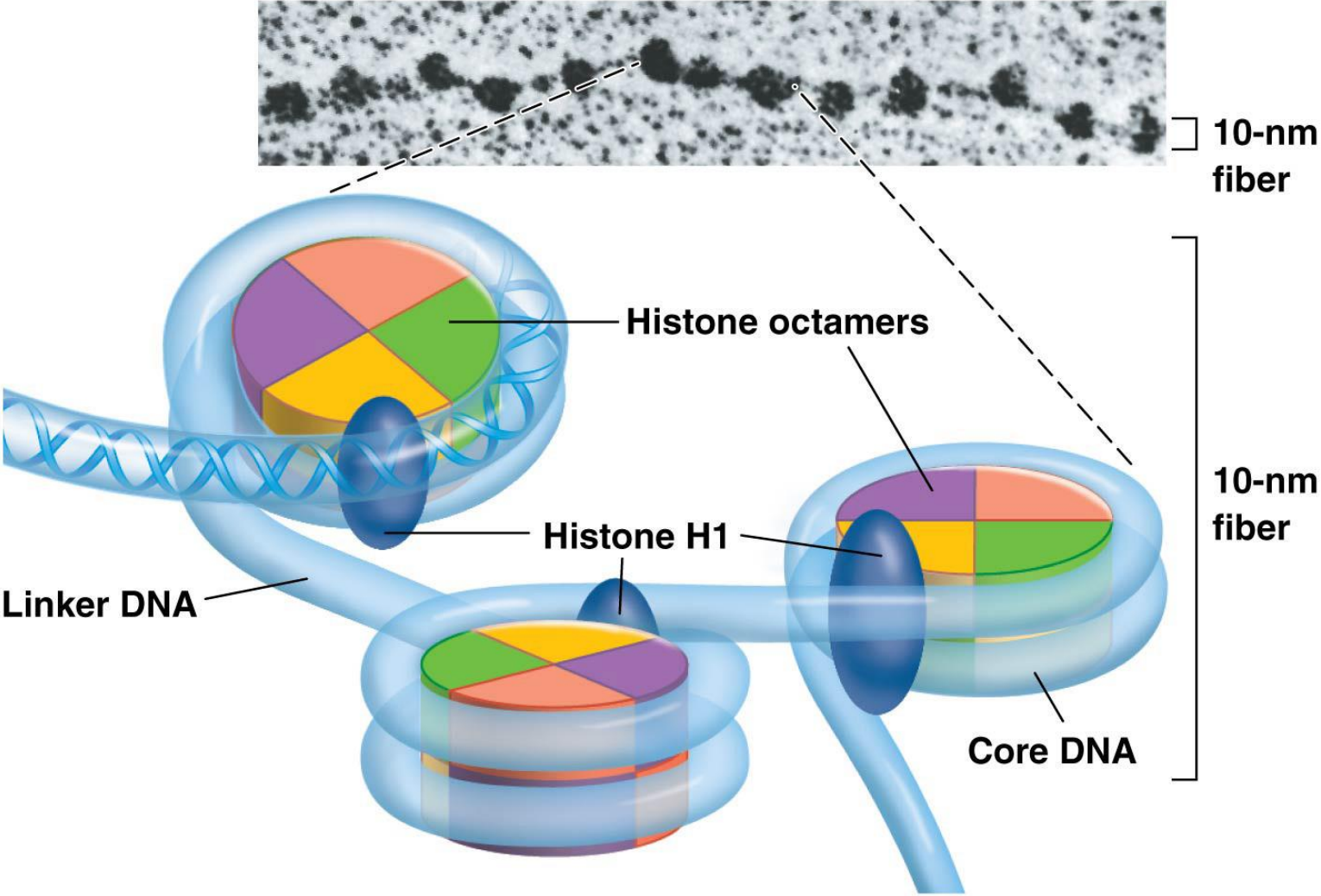


Estructura del nucleosoma



Condensación del material nuclear

(b) Beads on a string



Organización de la cromatina y estructura del cromosoma

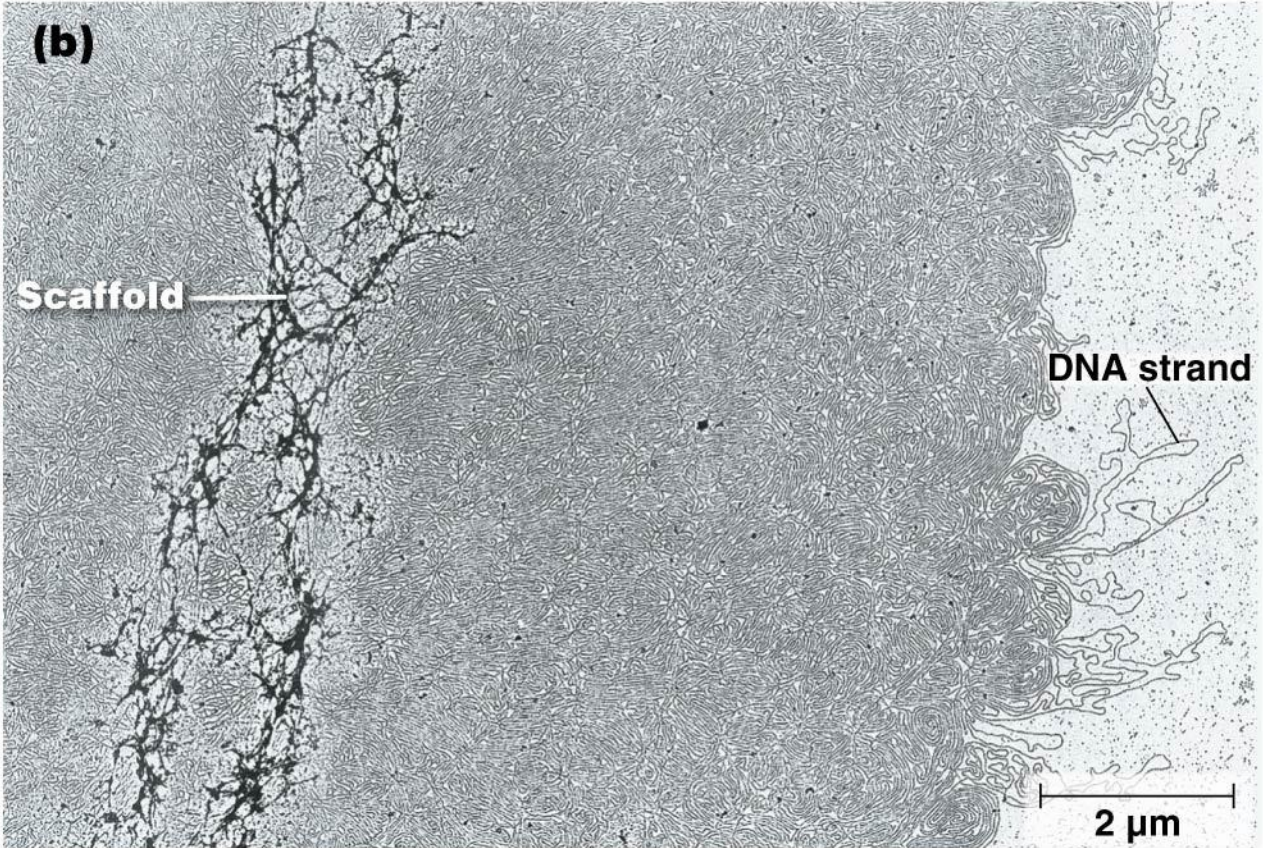
La cromatina existe en una fibra de 30 nm o más condensada durante la interfase y alcanza su máxima condensación durante la metafase de la mitosis.

En la interfase los cromosomas tienen las fibras de ADN como lazos, de tamaño variable, unidos a una proteína no-histona del andamiaje cromosómico.

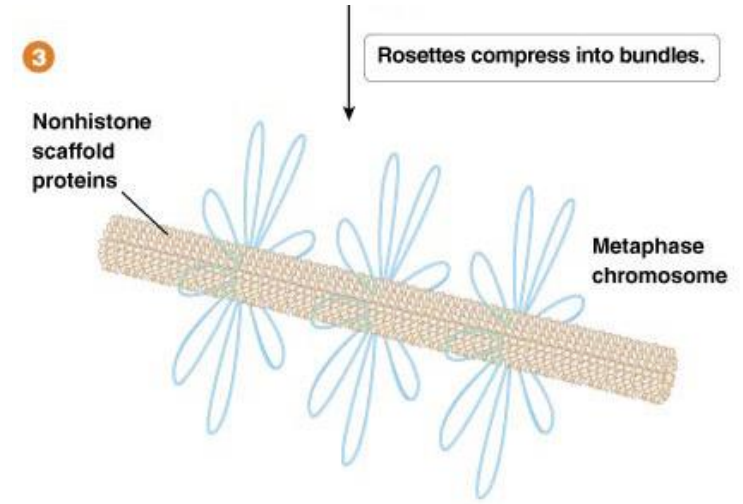
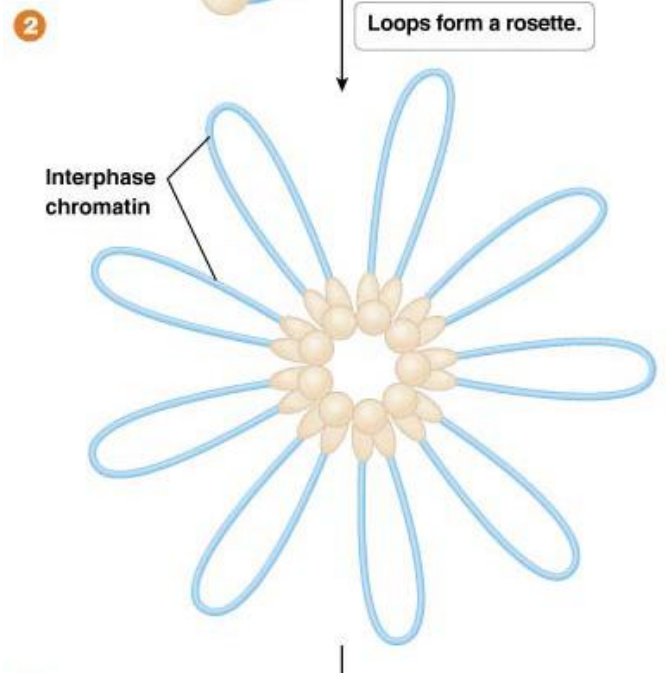
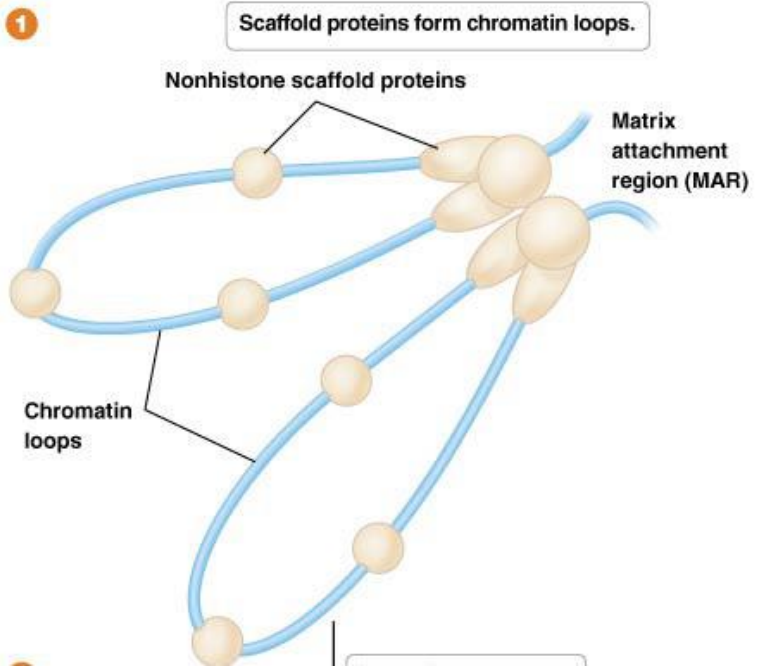
El andamiaje cromosómico (chromosome scaffold) es responsable de la forma peculiar de los cromosomas.

Los lazos del andamiaje forman la fibra de 300 nm.

El andamiaje cromosómico de un cromosoma en metafase



Modelo de la condensación de la cromatina: andamiaje de lazos radiales



Funciones de la compactación de la cromatina

La compactación de los cromosomas permite una separación eficiente de estos durante la anafase.

Los lazos de la cromatina, formados durante la condensación, desempeñan un rol importante en la regulación de la expresión de los genes.

La transcripción activa ocurre en segmentos de los lazos que están distantes de las zonas MARs, de forma tal que los lazos más grandes son más activos que los pequeños.

Replicación del ADN

La integridad de la secuencia de nucleótidos (i.e., la información) en el ADN es de suma importancia.

El mecanismo general para la replicación del ADN es el mismo en todos los organismos.

A medida que los organismos divergieron y aumentaron su complejidad, aparecieron algunas diferencias en las proteínas y enzimas involucradas en la replicación.

Tres atributos de la replicación compartidos por todos los organismos

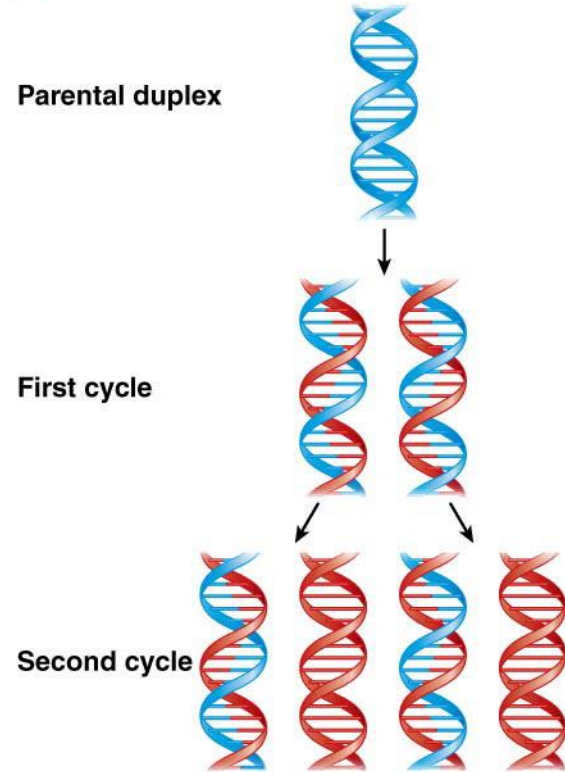
1. Cada hebra del ADN parental permanece intacta durante la replicación.
2. Cada hebra parental sirve de plantilla para la formación de una hebra hija complementaria y antiparalela a la que le dio origen.
3. El completamiento de la replicación resulta en la formación de dos moléculas de doble hebra de ADN formadas por una hebra parental y una hija.

Tres modelos propuestos para la replicación del ADN

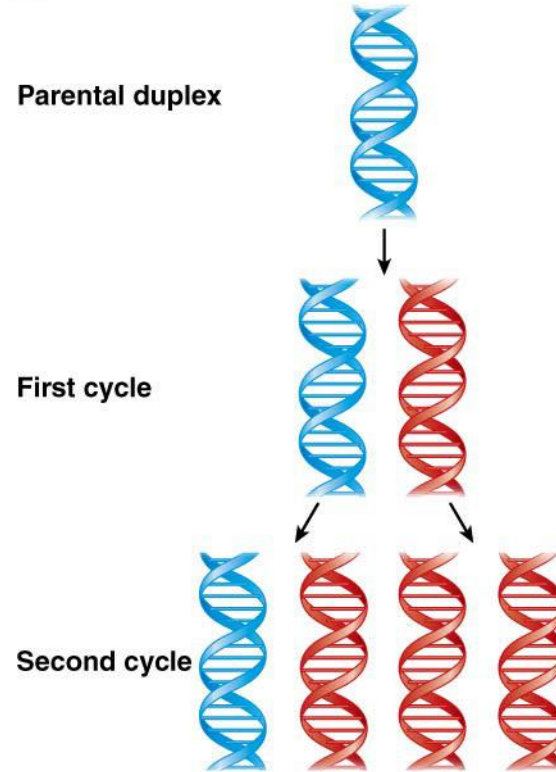
1. Replicación **semiconservativa** del ADN: las dobles hebras nuevas contienen una hebra parental y otra hija.
2. Replicación **conservativa** del ADN: una de las dobles hebras nuevas contiene ambas hebras parentales y la otra ambas hebras hijas.
3. Replicación **dispersiva** del ADN: las dobles hebras nuevas contienen segmentos intercalados de hebras parentales y hebras hijas.

Tres modelos propuestos para la replicación del ADN

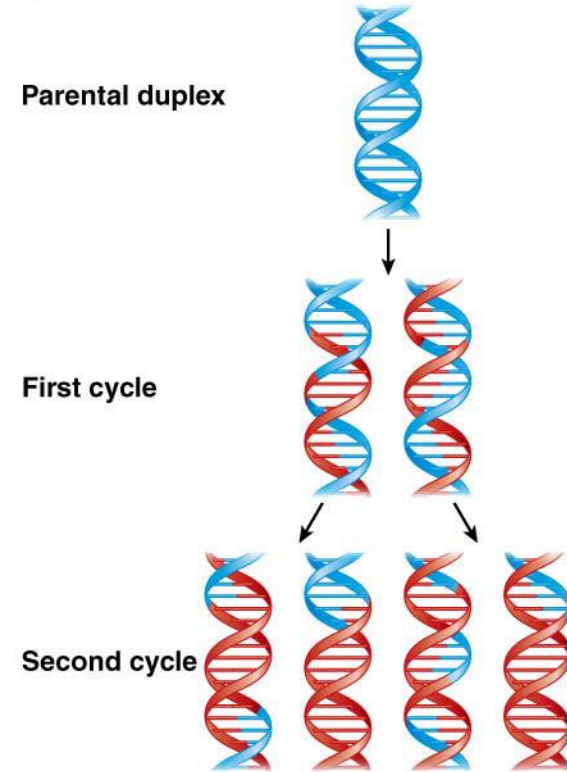
1 Semiconservative replication



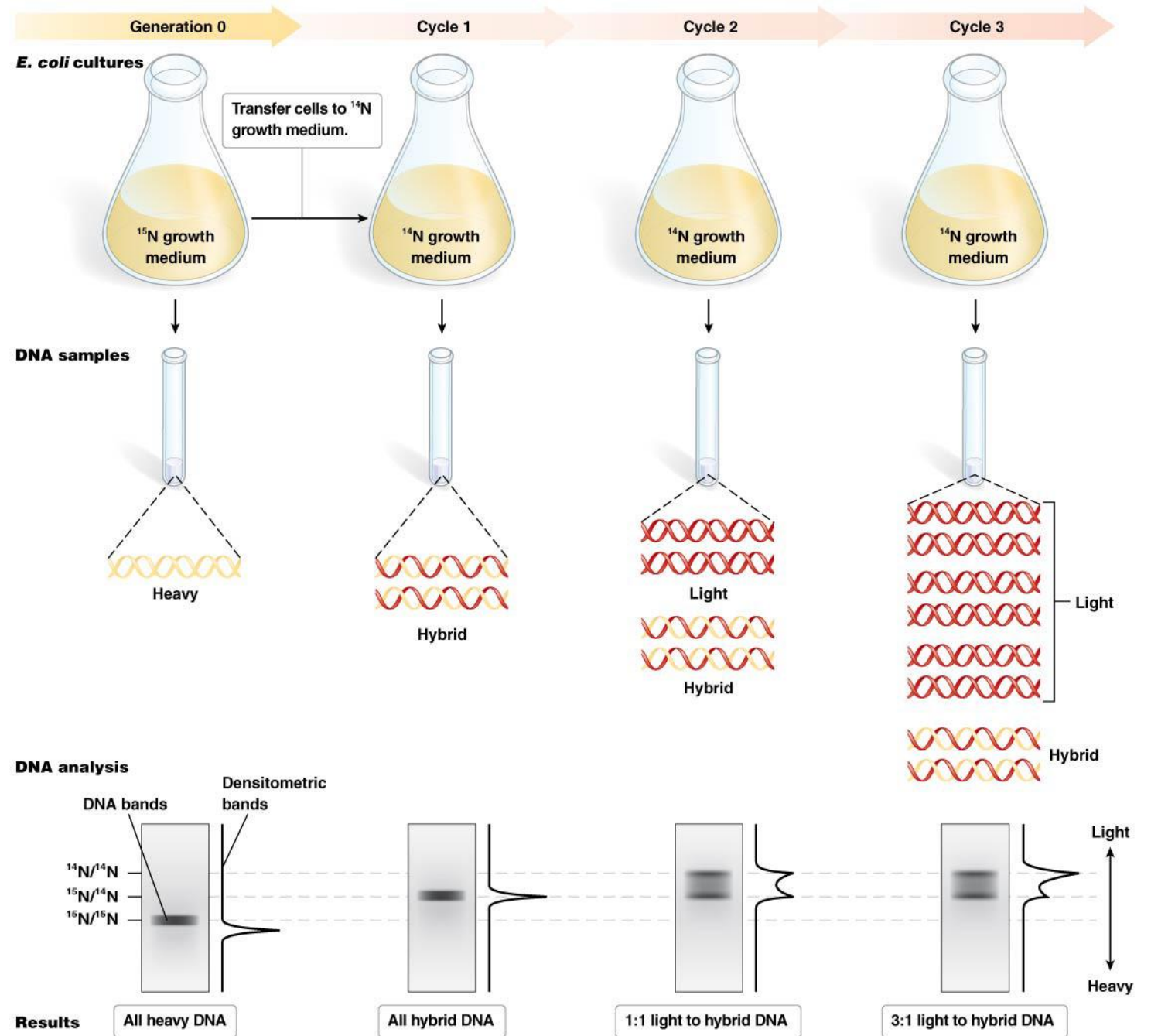
2 Conservative replication



3 Dispersive replication



Experimento de Meselson-Stahl que prueba la replicación semiconservativa.



Origen y direccionalidad de la replicación del ADN bacteriano

La replicación del ADN, la mayor parte de la veces, es bidireccional. Ocurre en ambas direcciones desde un mismo punto de origen en el cromosoma bacteriano.

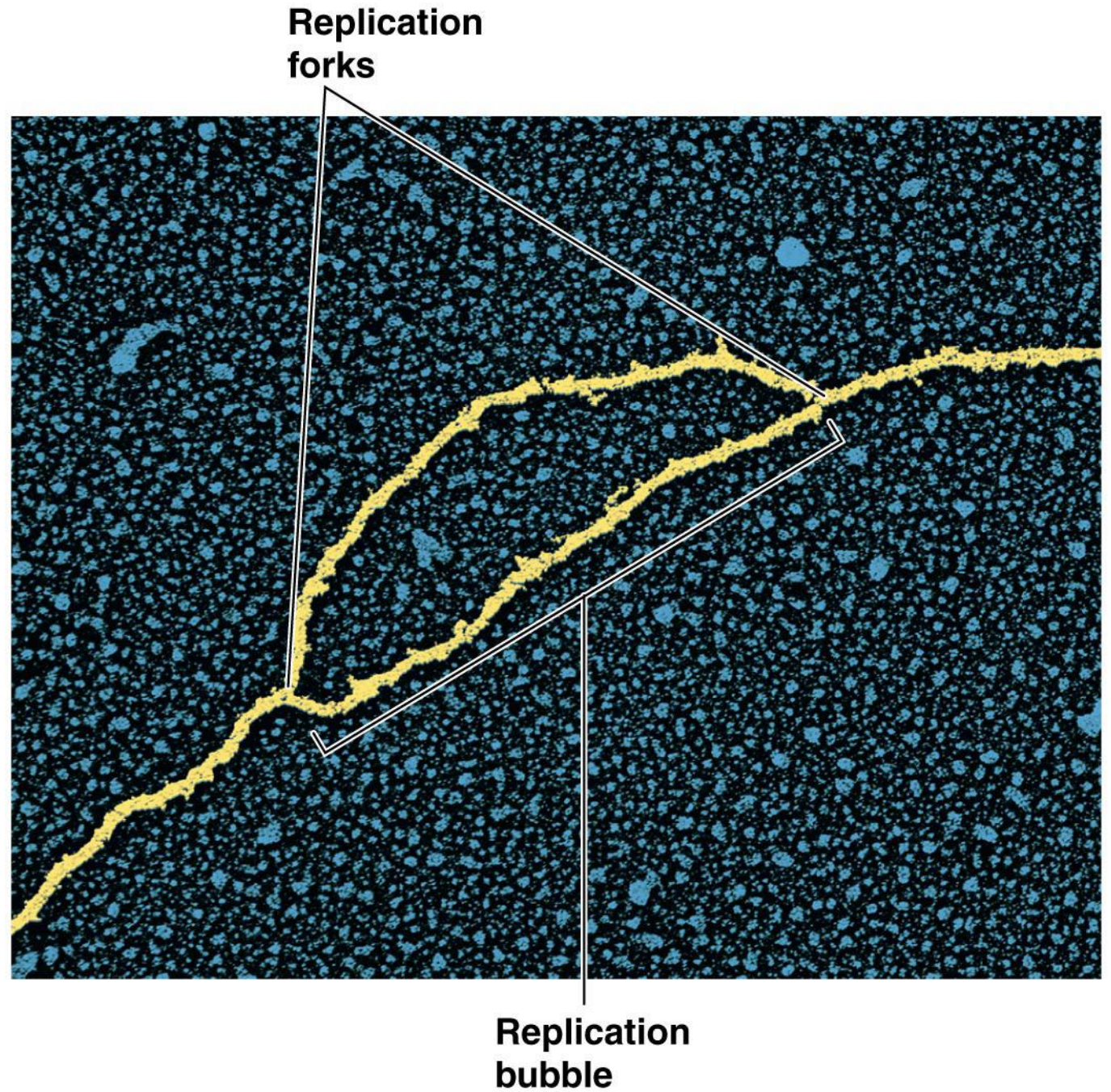
En los cromosomas eucarióticos existen múltiples puntos de origen para la replicación.

John Cairn, en 1963, reportó la primera evidencia del punto de origen de la replicación en bacterias.

Cairn mostró la expansión alrededor del origen de la replicación, formando una **burbuja de replicación** una vez que el proceso está en desarrollo.

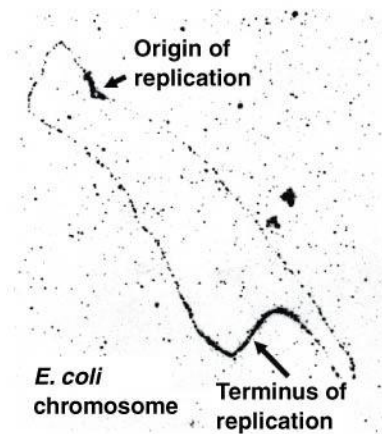
En cada extremo de la burbuja hay una **horquilla de replicación**, el proceso se completa cuando las horquillas se encuentran.

**Burbuja y horquillas
en la replicación del
ADN.**

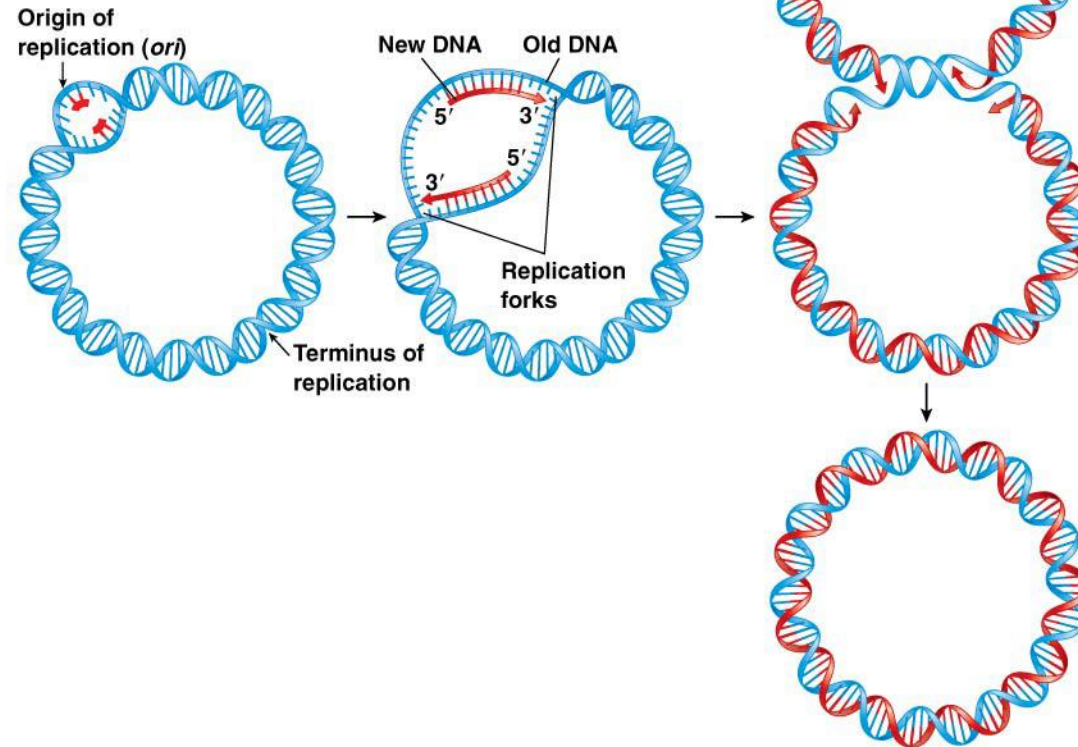


Replicación bidireccional del ADN

(a) Bidirectional replication proof



(b) Bidirectional replication model



Múltiples sitios de origen de la replicación en eucariotas

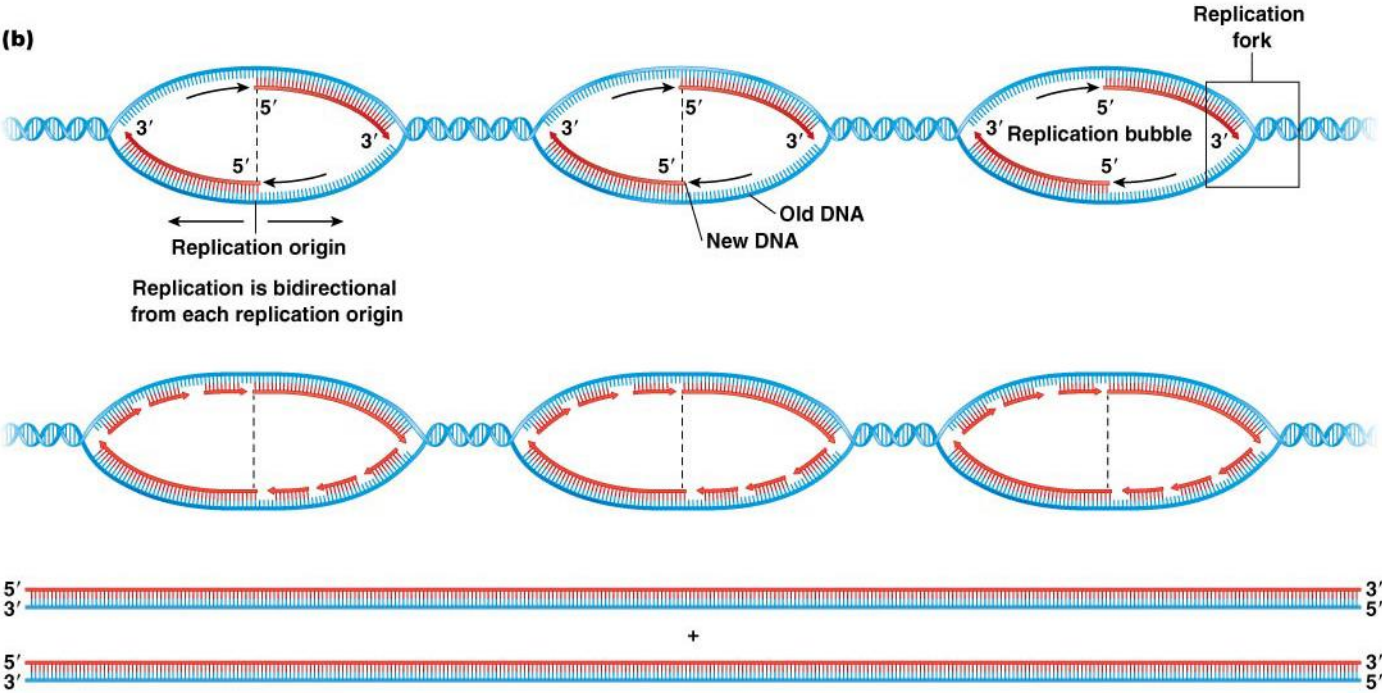
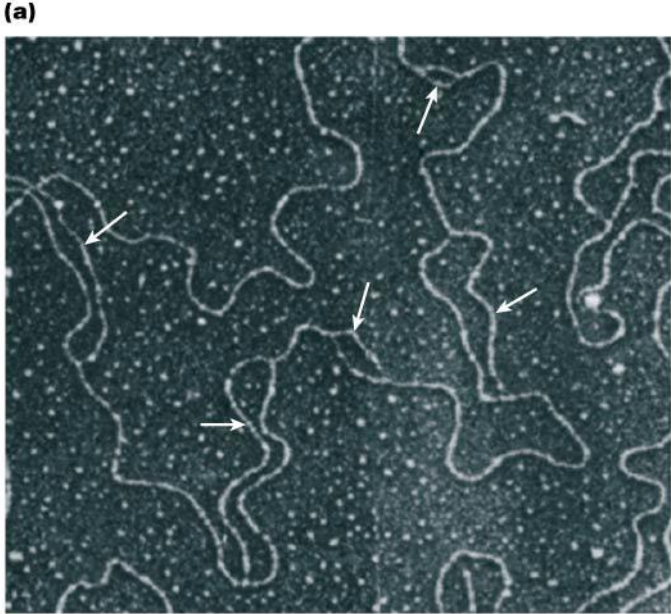
Los análisis de radiografías muestran que en los cromosomas eucarióticos existen múltiples sitios en los que se inicia la replicación.

En los genomas eucarióticos grandes hay miles de sitios de origen de la replicación separados por 40 000 a 50 000 pares de bases.

El genoma humano contiene más de 10 000 orígenes.

La tasa de replicación del ADN varía entre diferentes tipos de células.

Múltiples sitios de origen de la replicación en un mismo cromosoma de *D. melanogaster*



Duplicación precisa del ADN durante la replicación

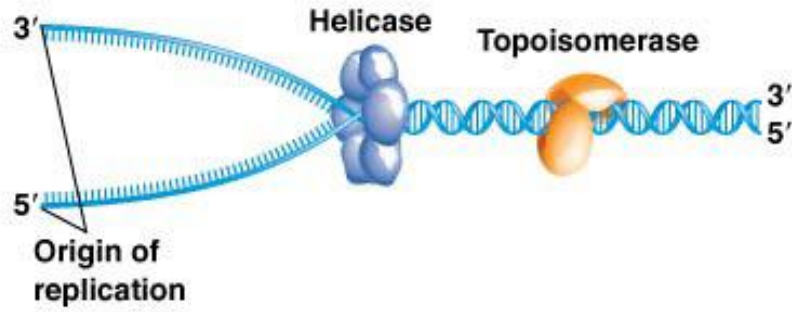
El proceso de replicación está mejor estudiado en bacterias que en el resto de los organismos.

A pesar de que la replicación es muy similar entre Bacteria, Archaea y Eukarya, los procesos no son idénticos.

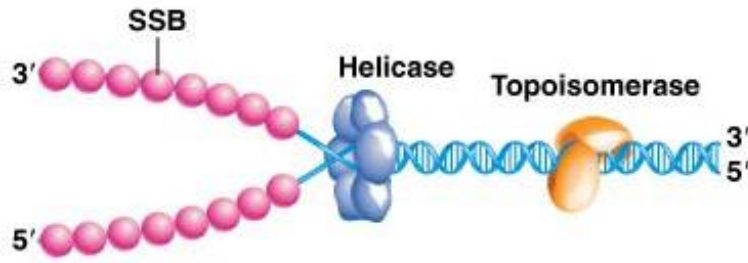
Las enzimas y proteínas involucradas son parte de grandes y complejas agregaciones llamadas **replisomas**.

Los replisomas se ensamblan en cada horquilla de replicación.

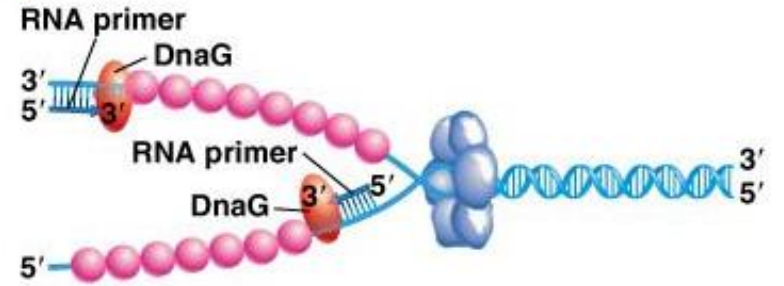
1 Helicase breaks hydrogen bonds. Topoisomerase relaxes super-coiling.



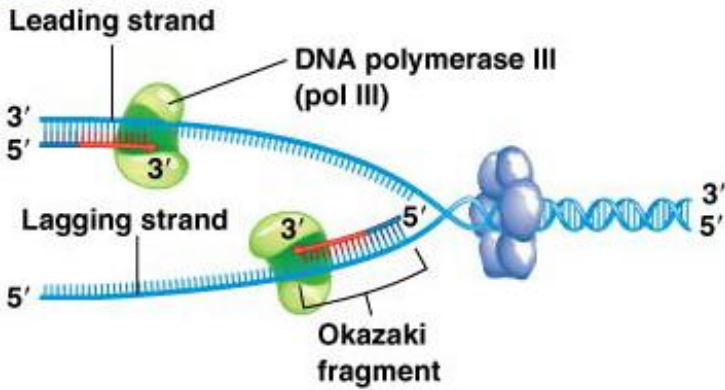
2 Single-stranded binding (SSB) protein prevents reannealing.



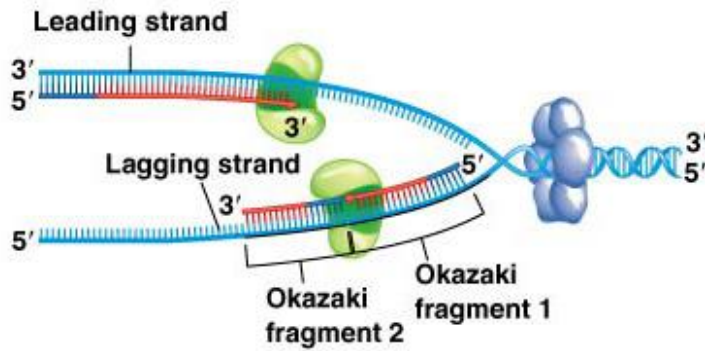
3 DnaG synthesizes RNA primers.



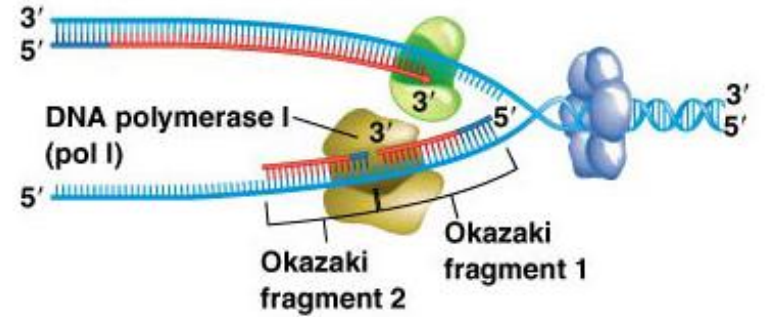
4 DNA polymerase III synthesizes daughter strand.



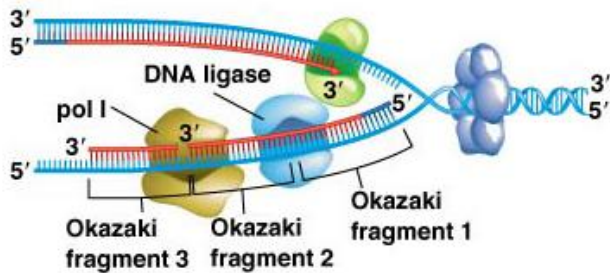
5 DNA polymerase III elongates the leading strand continuously and the lagging strand discontinuously.



6 DNA polymerase I removes and replaces nucleotides of the RNA primer.



7 DNA ligase joins Okazaki fragments.



Protein	DNA topoisomerase	Helicase (DnaB)	SSB	Primase	DNA pol III	DNA pol I	DNA ligase
Icon							
Role	Relaxes supercoiling	Unwinds the double helix	Prevents reannealing of separated strands	Synthesizes RNA primers	Synthesizes DNA	Removes and replaces RNA primer with DNA	Joins DNA segments

Sitios de origen de la replicación

Los sitios de origen de la replicación en bacterias tienen secuencias similares (conservadas) pero no idénticas. Las **secuencias de consenso**, reflejan los nucleótidos que se encuentran más a menudo en cada posición del ADN de la región conservada.

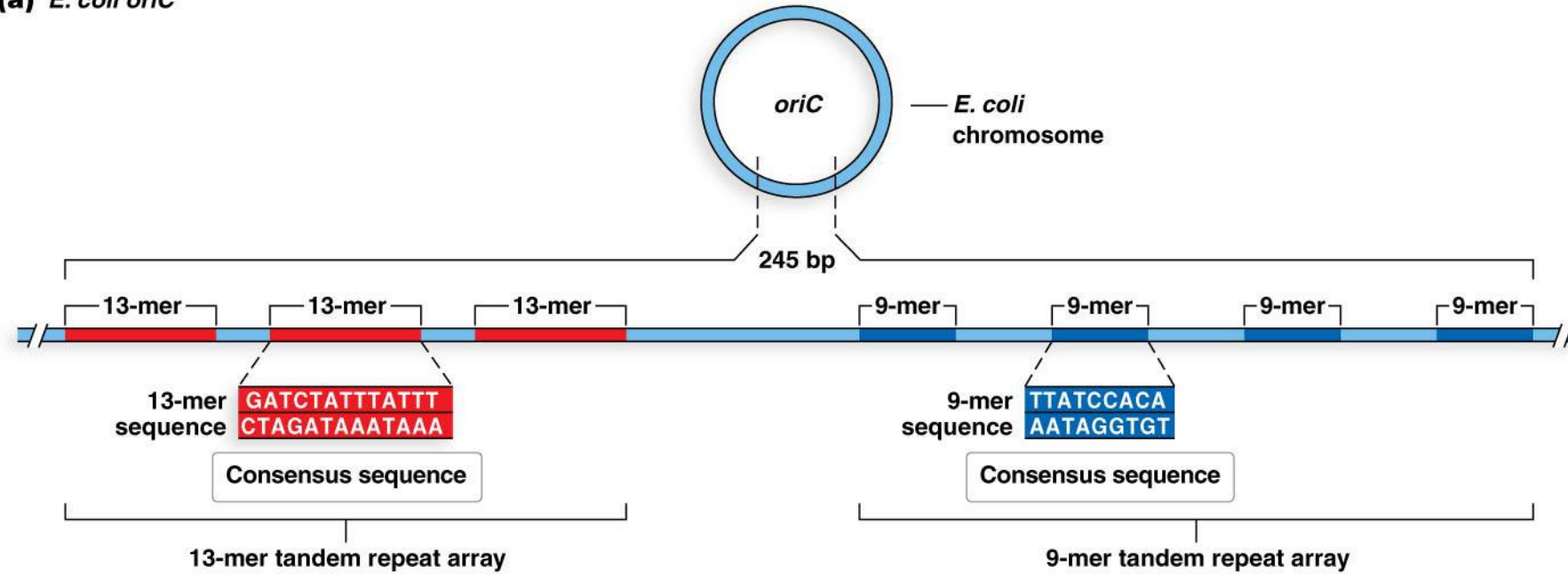
Las secuencias de 13-meros y 9-meros de *oriC* son conservadas y tienen un rol esencial en la replicación.

Las secuencias de origen de la replicación de la levadura *S. cerevisiae* son las mejor caracterizadas hasta el presente.

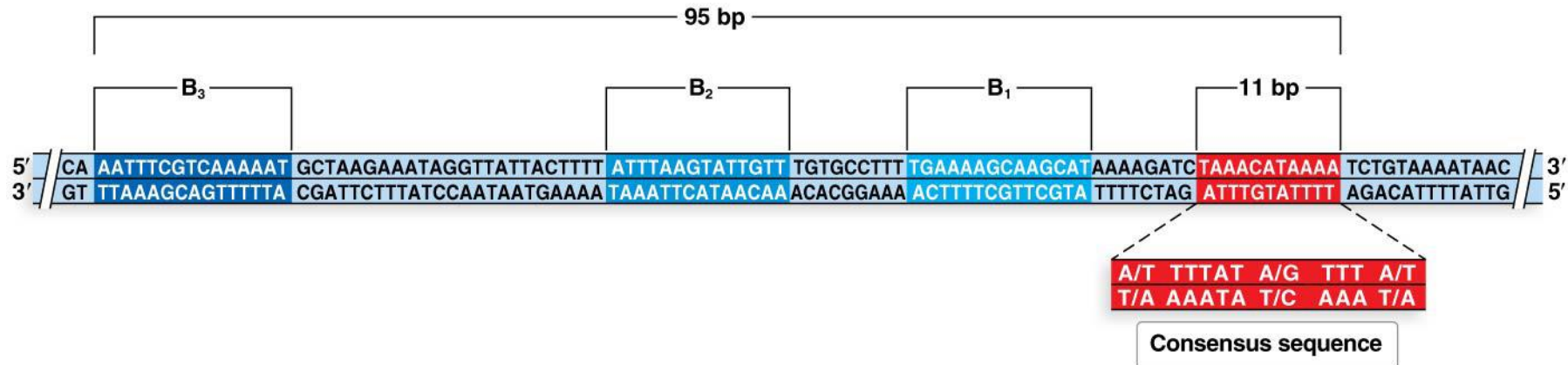
Los múltiples sitios de origen de la replicación son llamados secuencias de replicación autónomas (autonomously replicating sequences ARS). La organización y la secuencia de las ARS es similar a través de todo el genoma de la levadura.

Secuencias de origen de la replicación en *E. coli* y en *S. cerevisiae*

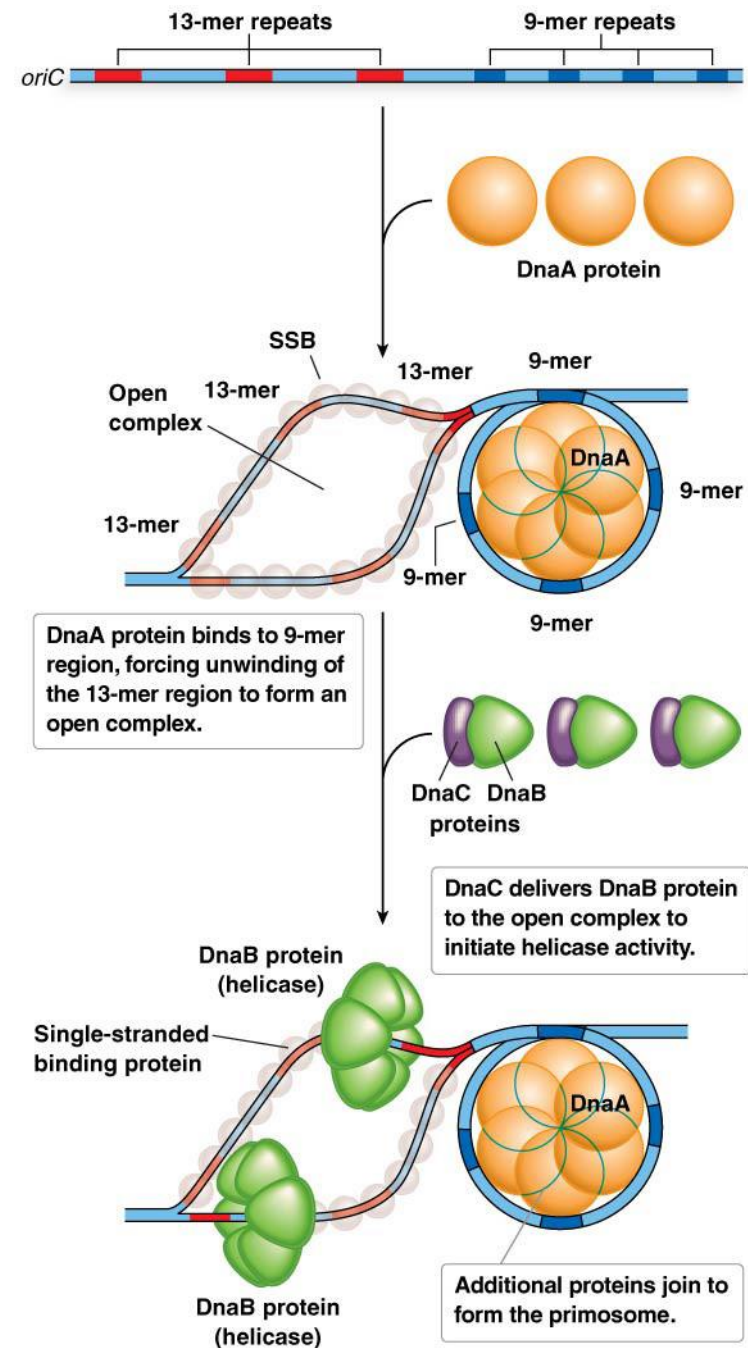
(a) *E. coli* *oriC*



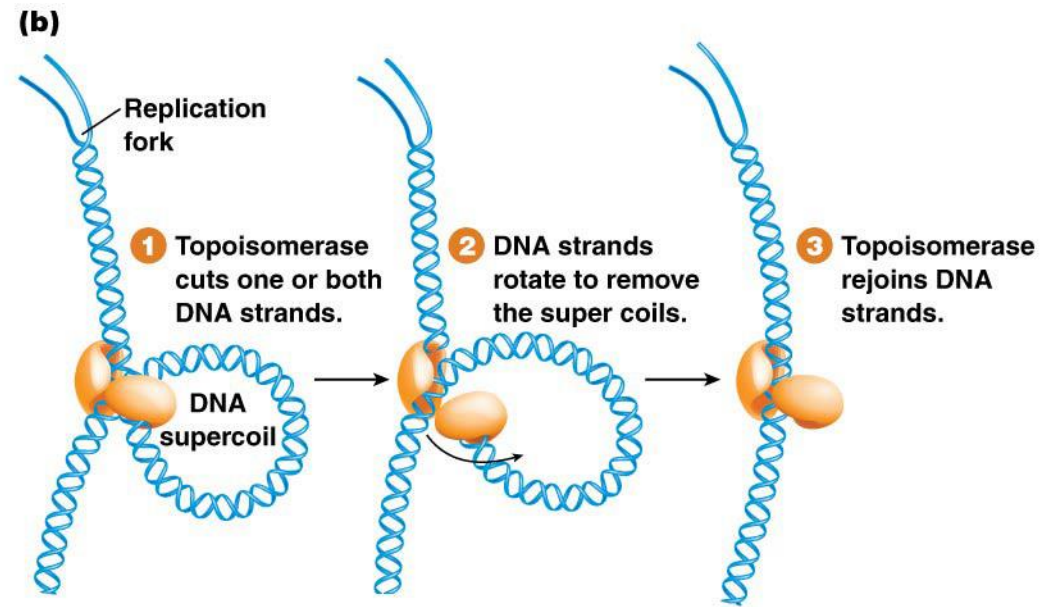
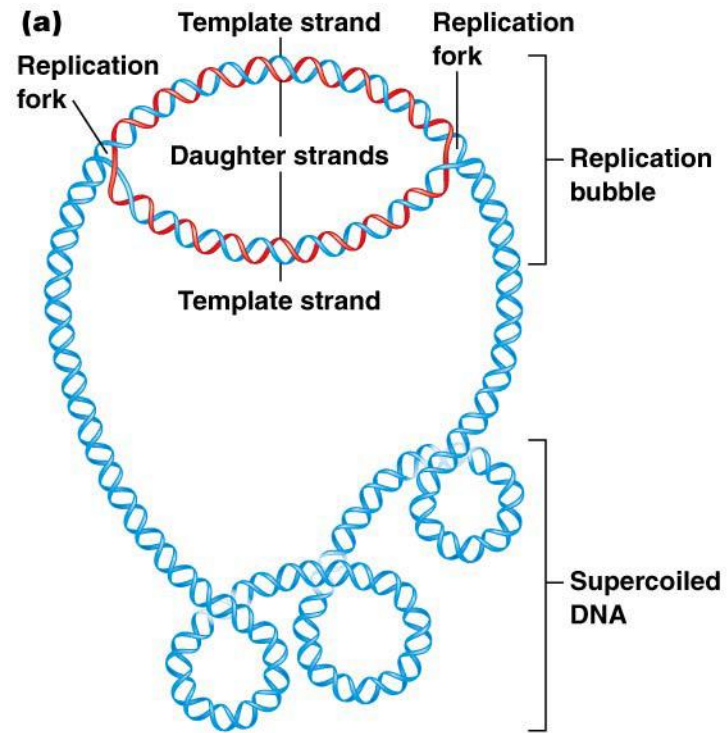
(b) *S. cerevisiae* autonomous replicating sequence 1 (ARS1)



El inicio de la replicación en *oriC* requiere las proteínas DnaA, DnaB y DnaC.



Corte y liberación del ADN superenrollado por la topoisomerasa



Los cebadores (primers) ARN en la replicación

La ADN polimerasa alarga las hebras de ADN añadiendo nucleótidos al extremo 3' de una hebra preexistente.

La polimerasa no puede iniciar la síntesis de una hebra de ADN por si sola.

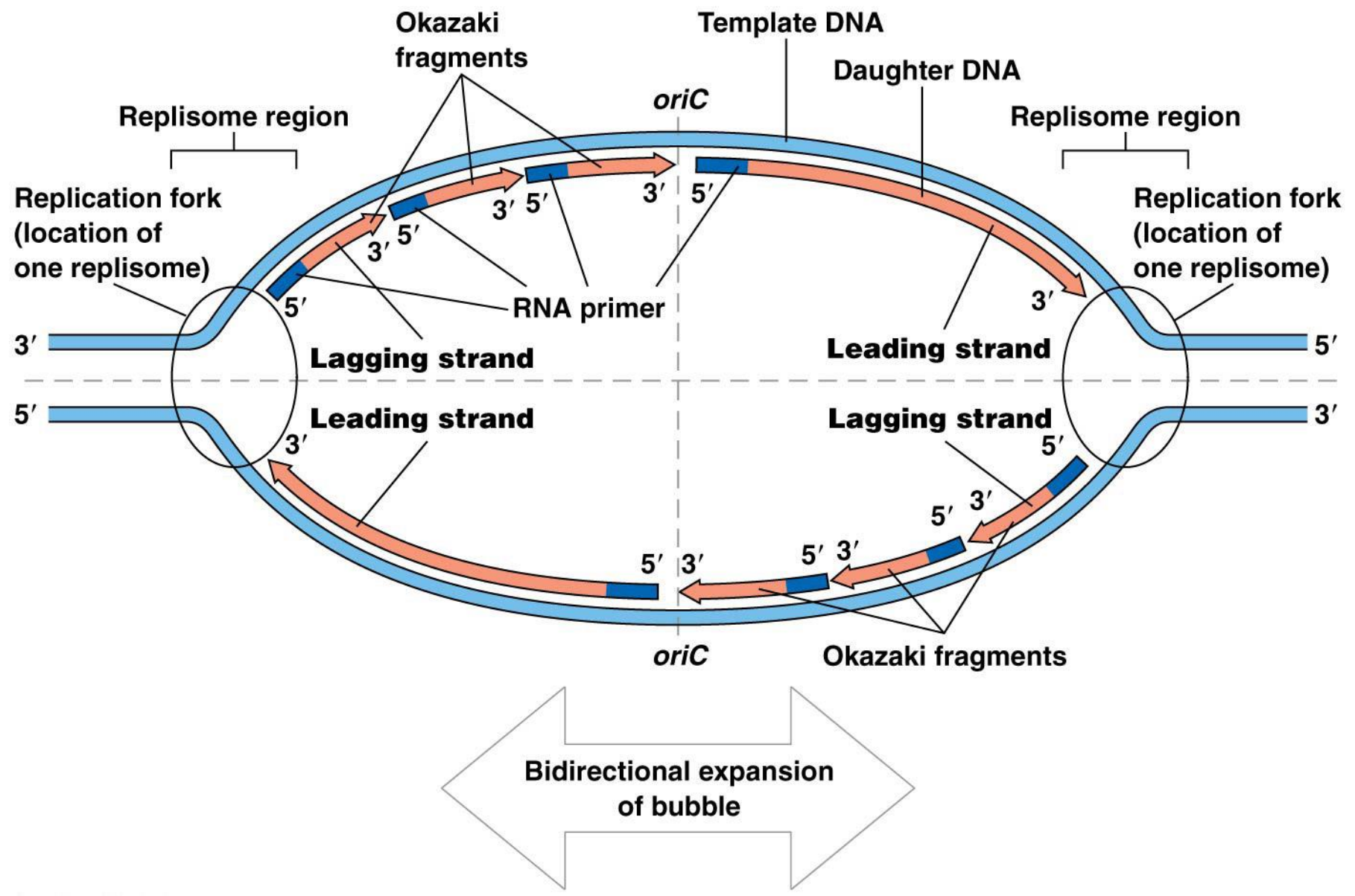
Se necesitan cebadores ARN los que son sintetizados por una ARN polimerasa especializada que se llama **primasa**.

La primasa une las proteínas DnaA, DnaB y DnaC a *oriC*.

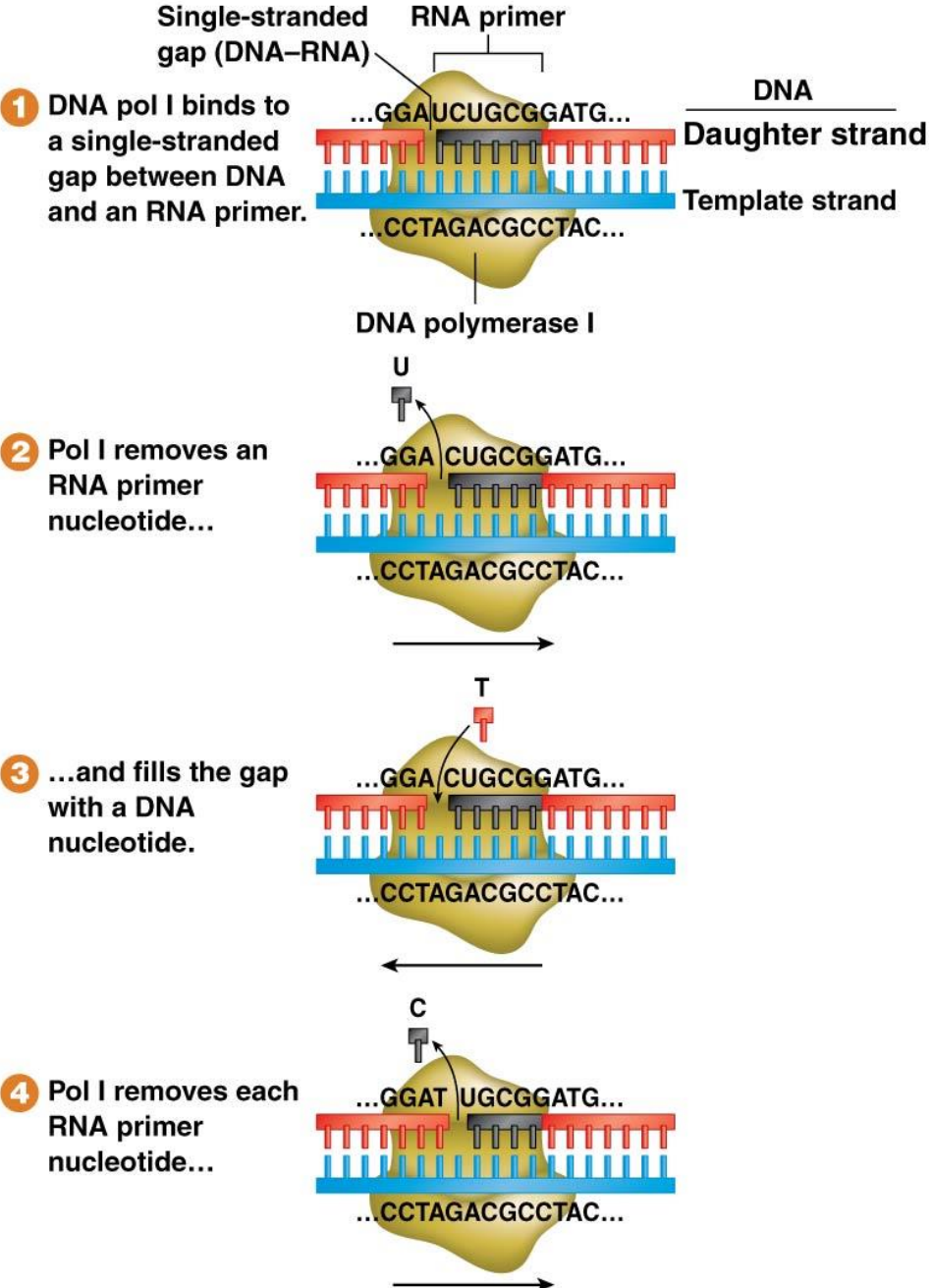
En *E. coli*, las hebras hijas son sintetizadas por la **holoenzima ADN polimerasa III (pol III)**.

Holoenzima se refiere a un complejo multiproteico en el que la enzima central está asociada con los componentes adicionales necesarios para realizar la función completa.

El replisoma se encuentra en cada horquilla de replicación y contiene dos copias de **pol III**.

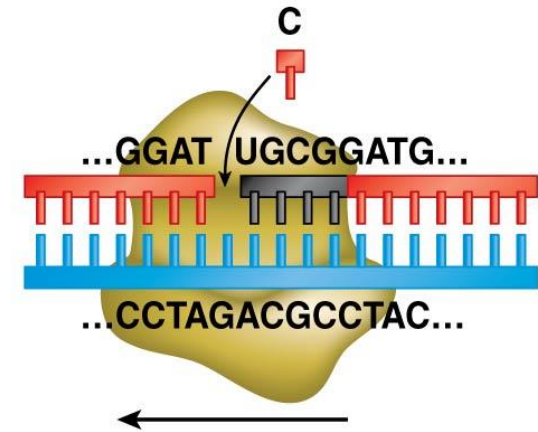


Remoción y remplazo de los nucleótidos del cebador ARN y ligamiento de los fragmentos de Okazaki en *E. coli*.

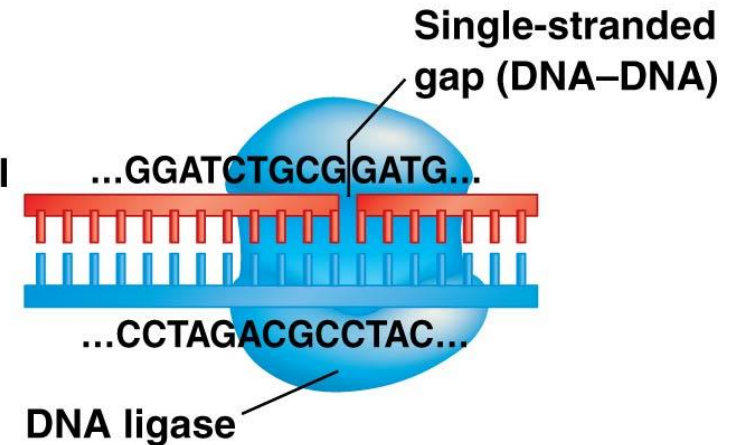


Remoción y remplazo de los nucleótidos del cebador ARN y ligamiento de los fragmentos de Okazaki en *E. coli*.

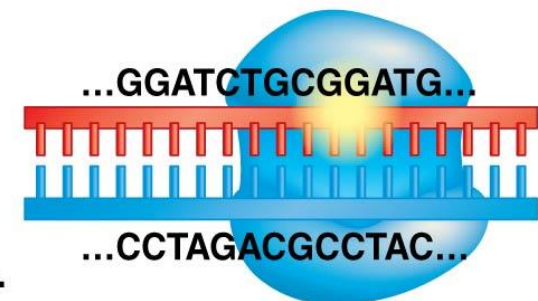
5 ...and replaces it with a DNA nucleotide.



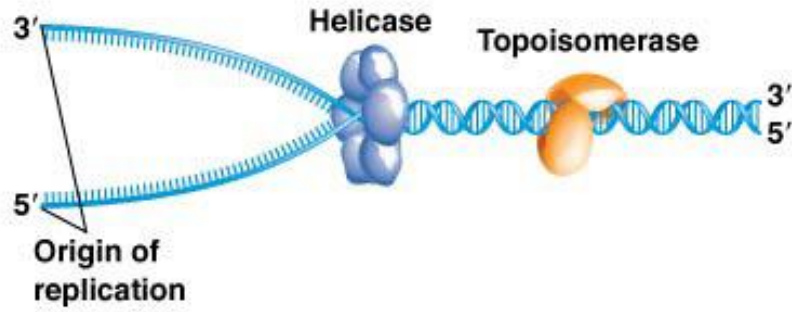
6 When primer removal is complete, DNA ligase replaces poll at DNA–DNA single-stranded gaps and ...



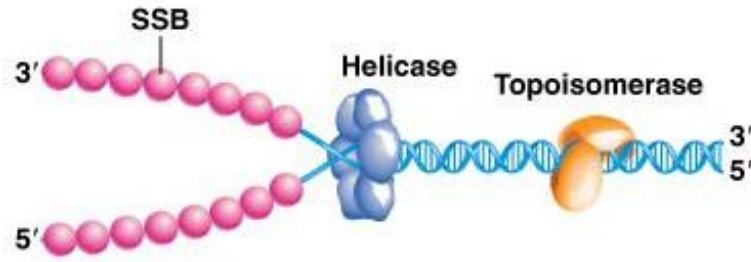
7 ...catalyzes formation of a phosphodiester bond to join Okazaki fragments.



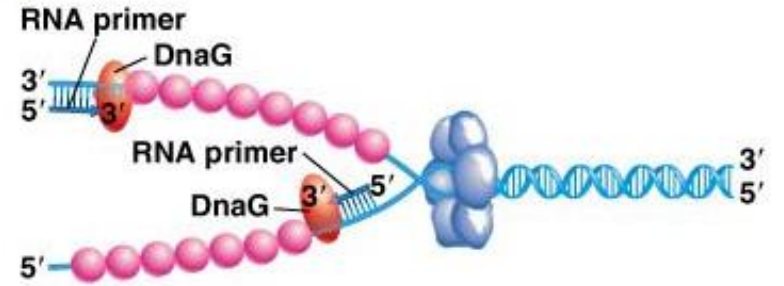
1 Helicase breaks hydrogen bonds. Topoisomerase relaxes super-coiling.



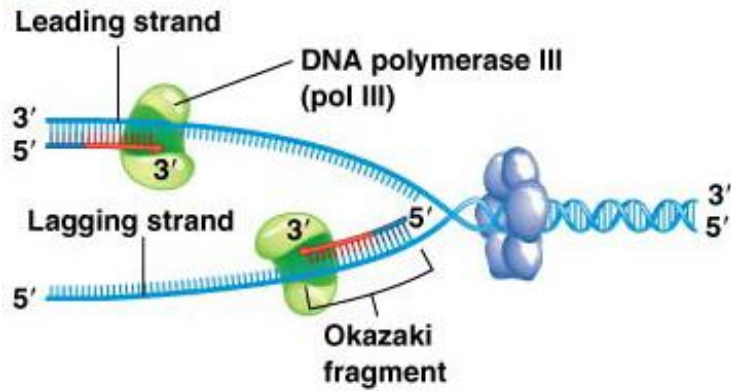
2 Single-stranded binding (SSB) protein prevents reannealing.



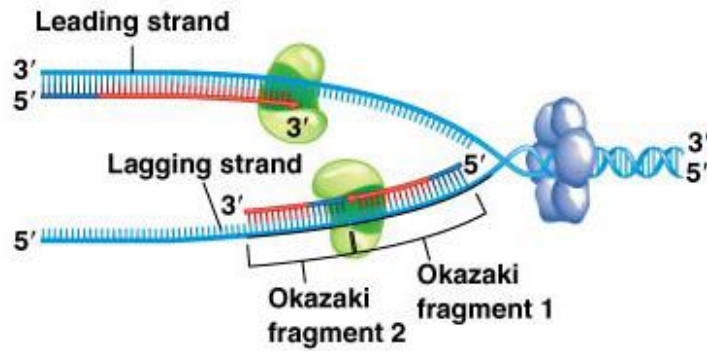
3 DnaG synthesizes RNA primers.



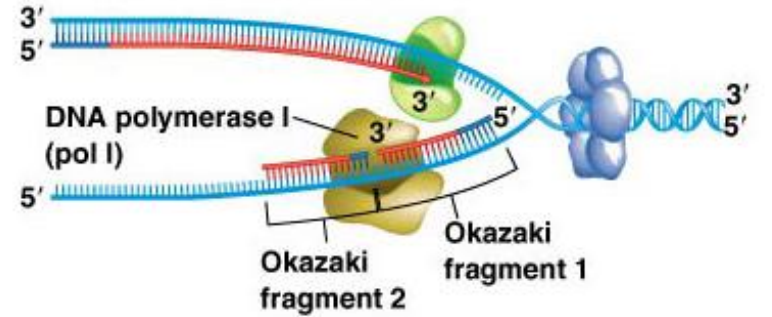
4 DNA polymerase III synthesizes daughter strand.



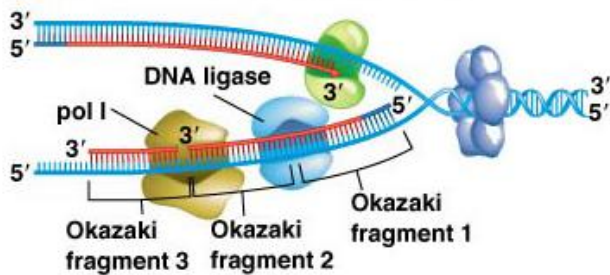
5 DNA polymerase III elongates the leading strand continuously and the lagging strand discontinuously.



6 DNA polymerase I removes and replaces nucleotides of the RNA primer.



7 DNA ligase joins Okazaki fragments.



Protein	DNA topoisomerase	Helicase (DnaB)	SSB	Primase	DNA pol III	DNA pol I	DNA ligase
Icon							
Role	Relaxes supercoiling	Unwinds the double helix	Prevents reannealing of separated strands	Synthesizes RNA primers	Synthesizes DNA	Removes and replaces RNA primer with DNA	Joins DNA segments

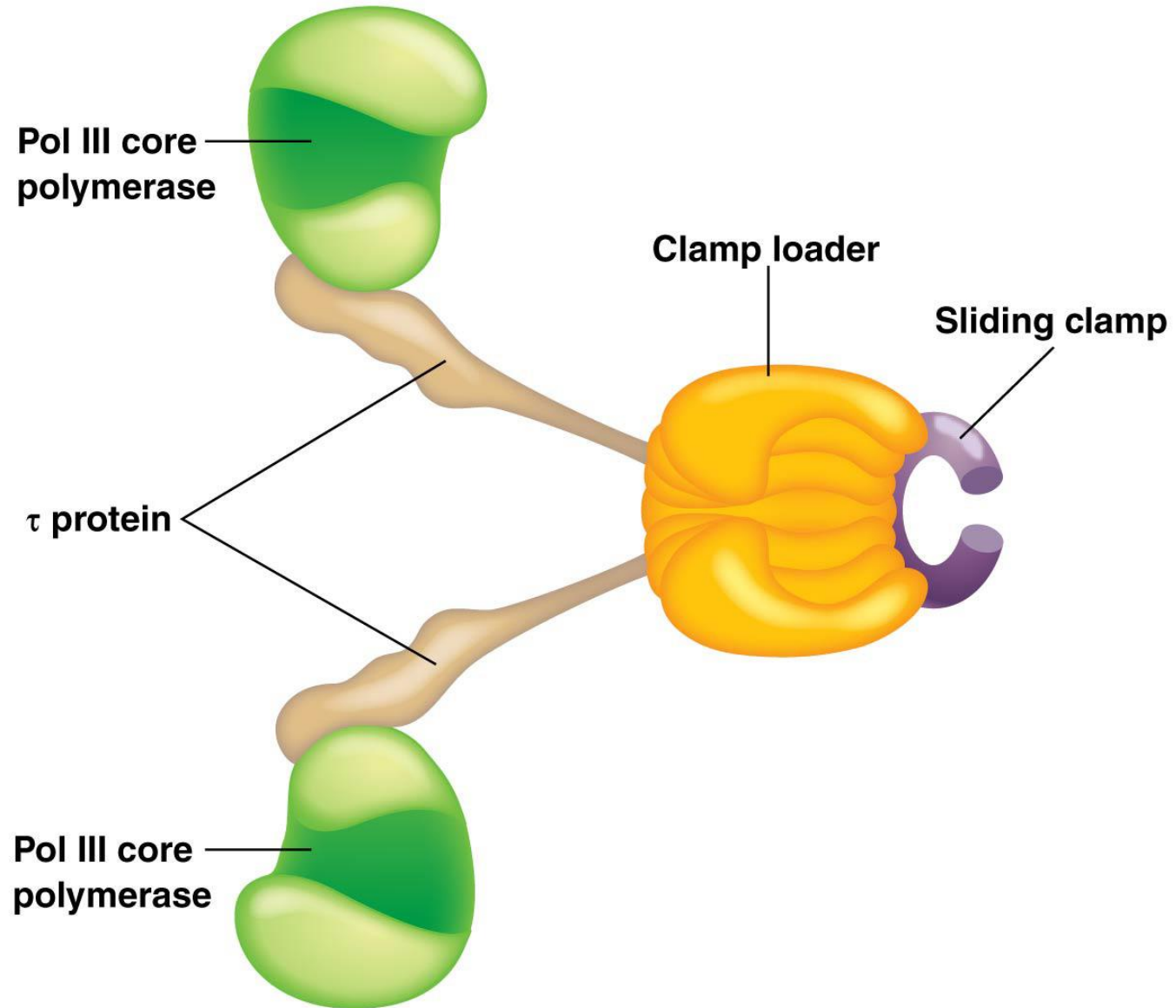
Síntesis simultánea de la hebra líder y la hebra retardada

Cada replisoma realiza la replicación de las hebras líder y retardada simultáneamente.

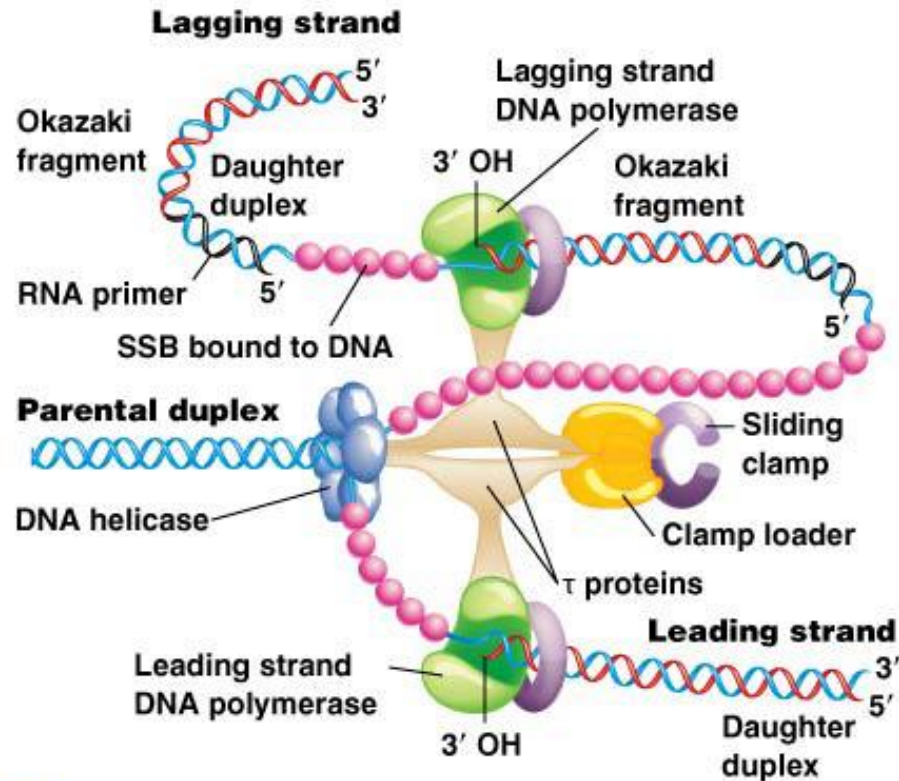
La holoenzima ADN pol III contiene 11 subunidades, con dos pol III centrales, cada una atada a una copia diferente de la proteína tau (τ).

Las proteínas tau están unidas a un complejo proteico llamado “clamp loader” y hay dos proteínas adicionales que forman la “sliding clamp”.

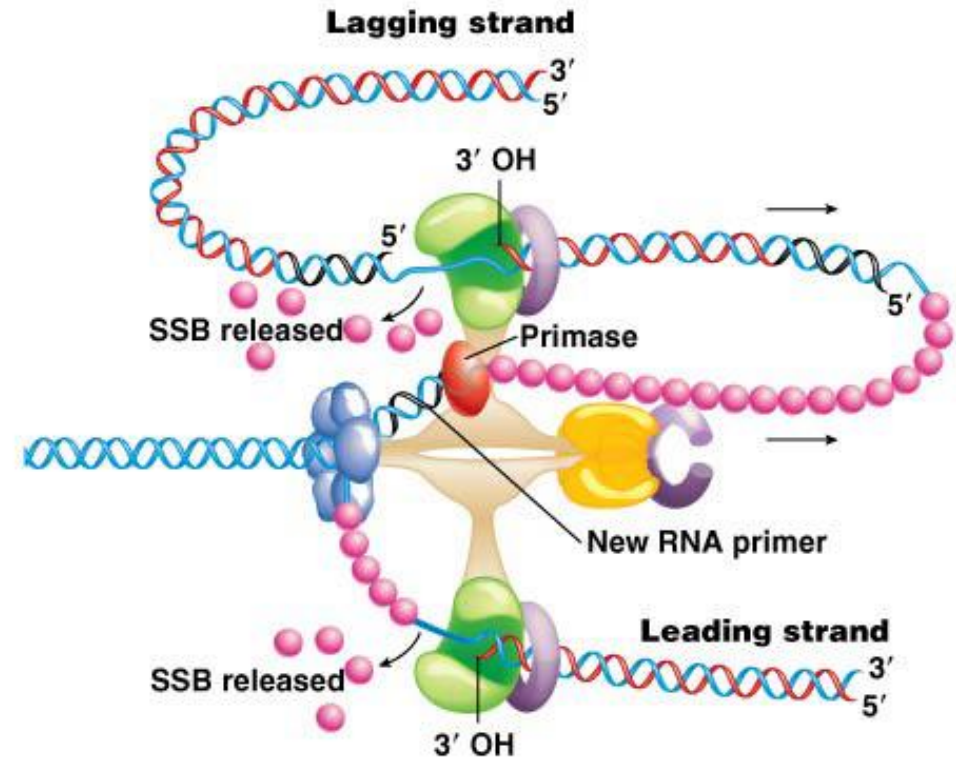
Holoenzima ADN pol III



Modelo del trombón para la replicación del ADN

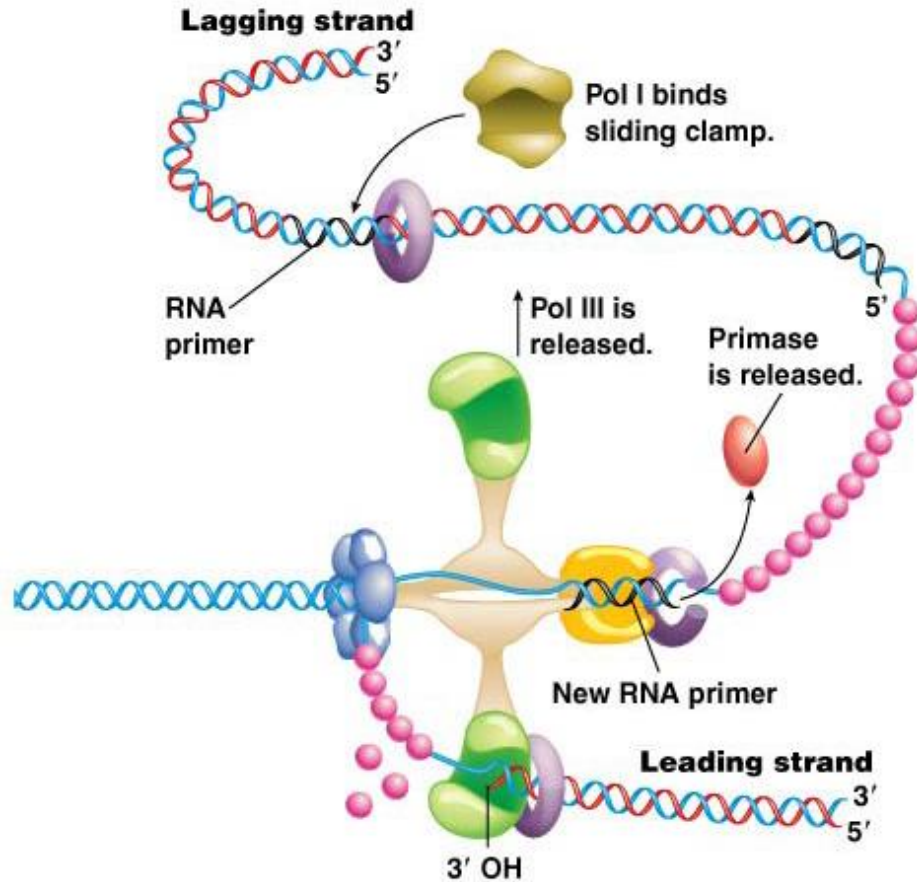


- 1 DNA helicase denatures the parental duplex, and SSB coats leading strand and lagging strand templates. The leading strand DNA pol III–sliding clamp complex synthesizes the leading strand continuously. The lagging strand pol III–sliding clamp complex synthesizes an Okazaki fragment.

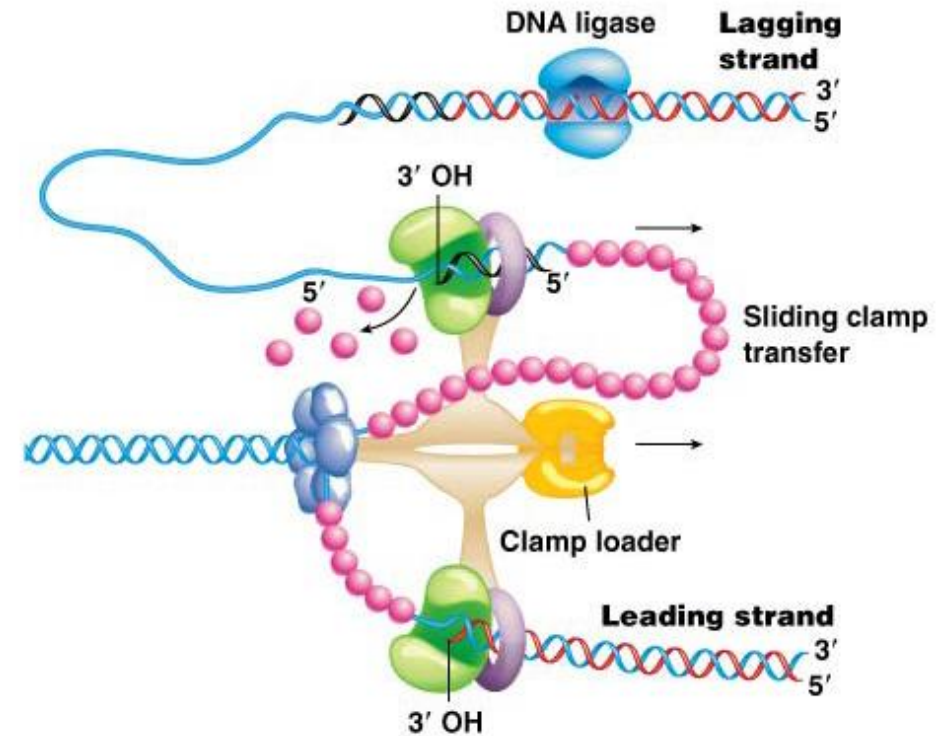


- 2 Primase binds the lagging strand template and synthesizes a new RNA primer. SSB is released ahead of leading strand and lagging strand synthesis, and ahead of RNA primer synthesis.

Modelo del trombón para la replicación del ADN



- 3** Lagging strand DNA pol III completes synthesis of an Okazaki fragment and is released by the sliding clamp. A DNA pol I replaces pol III to begin removal of the RNA primer and replacement of RNA nucleotides by DNA nucleotides.



- 4** DNA ligase joins Okazaki fragments. The clamp loader places a new sliding clamp near the 3' end of the RNA primer on the newly primed lagging strand. Lagging strand DNA pol III binds the sliding clamp and initiates synthesis of a new Okazaki fragment.

ADN polimerasas en eucariotas

Los eucariotas tienen muchas más ADN polimerasas que las bacterias.

La ADN polimerasa α realiza la síntesis de los cebadores ARN.

La polimerasa δ y la polimerasa ϵ realizan la síntesis de la hebra retardada y la hebra líder respectivamente.

Cada una interactúa con el antígeno nuclear de la proliferación de la célula (proliferating cell nuclear antigen PCNA) que funciona como la “sliding clamp”.

Table 7.1**DNA Replication Proteins and Enzymes**

Domain			Role in Replication
Bacteria	Eukarya	Archaea	
DnaA	Orc1–6	Orc1/Cdc6	Replication-origin recognition
DnaB, DnaC	Cdc6/Cdt1	Orc1/Cdc6	Helicase activity
	Mcm2–7	Mcm	
	GIN5	GIN5	
DnaG	Primase/pol α	Primase	Primer synthesis
DNA Pol III	DNA pol δ	Pol B	DNA synthesis
	DNA pol ϵ	Pol D	
DNA pol I	RPA	RPA	DNA synthesis
RnaseH	FEN1/DNA2	FEN1/DNA2	Primer removal
β (sliding) clamp	PCNA	PCNA	DNA polymerase progression
Tau protein	RFC	RFC	Replication fork progression

Table 7.2**Properties of Selected Bacterial, Eukaryotic, and Archaeal DNA Polymerases**

Polymerase	Functions
<i>Bacterial polymerases</i>	
DnaG	RNA primer synthesis
I	RNA primer removal, proofreading, mutation repair
III	DNA replication, proofreading
<i>Eukaryotic polymerases</i>	
Primase/ α	Primer synthesis and lagging strand synthesis
δ	Lagging strand synthesis, proofreading, DNA mutation repair
ε	Leading strand synthesis, proofreading, DNA mutation repair
<i>Archaea polymerases</i>	
Primase	Primer synthesis
PolB	DNA synthesis
PolD	DNA synthesis

Corrección de la secuencia de ADN

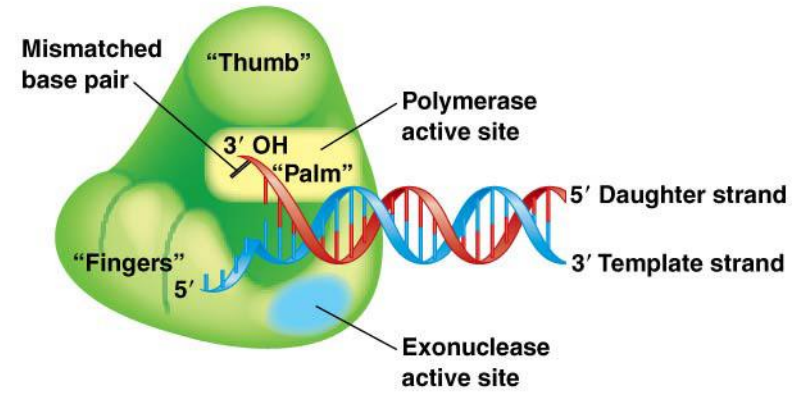
La replicación es muy precisa lo que se debe a que la polimerasa realiza la corrección del ADN para enmendar los errores ocasionales.

Los errores en la replicación ocurren una vez cada un billón de nucleótidos incorporados en *E. coli*.

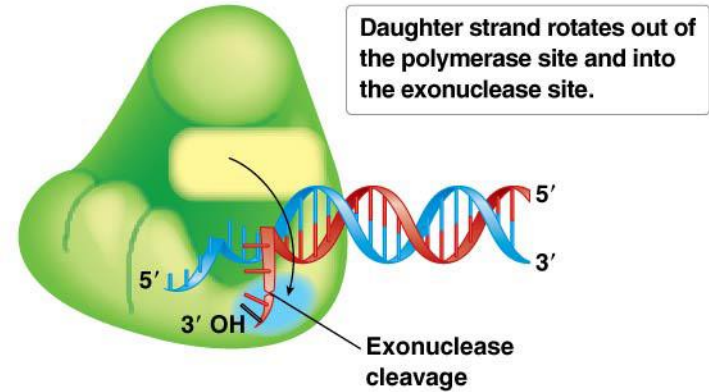
La posibilidad de hacer corrección en las ADN polimerasas está relacionada con su actividad 3'-a- 5' exonucleasa.

Corrección de la secuencia por la ADN polimerasa.

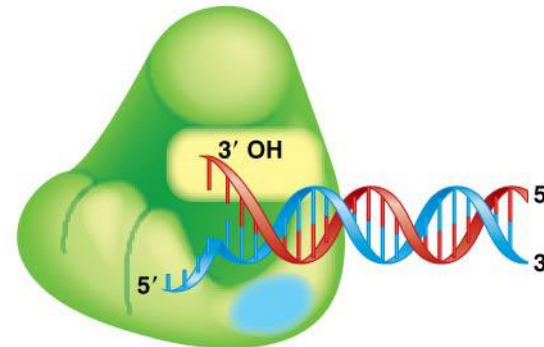
(a) DNA polymerase error



(b) Exonuclease removal of mismatched base pair



(c) Daughter strand resumes DNA synthesis



Fin del proceso de replicación

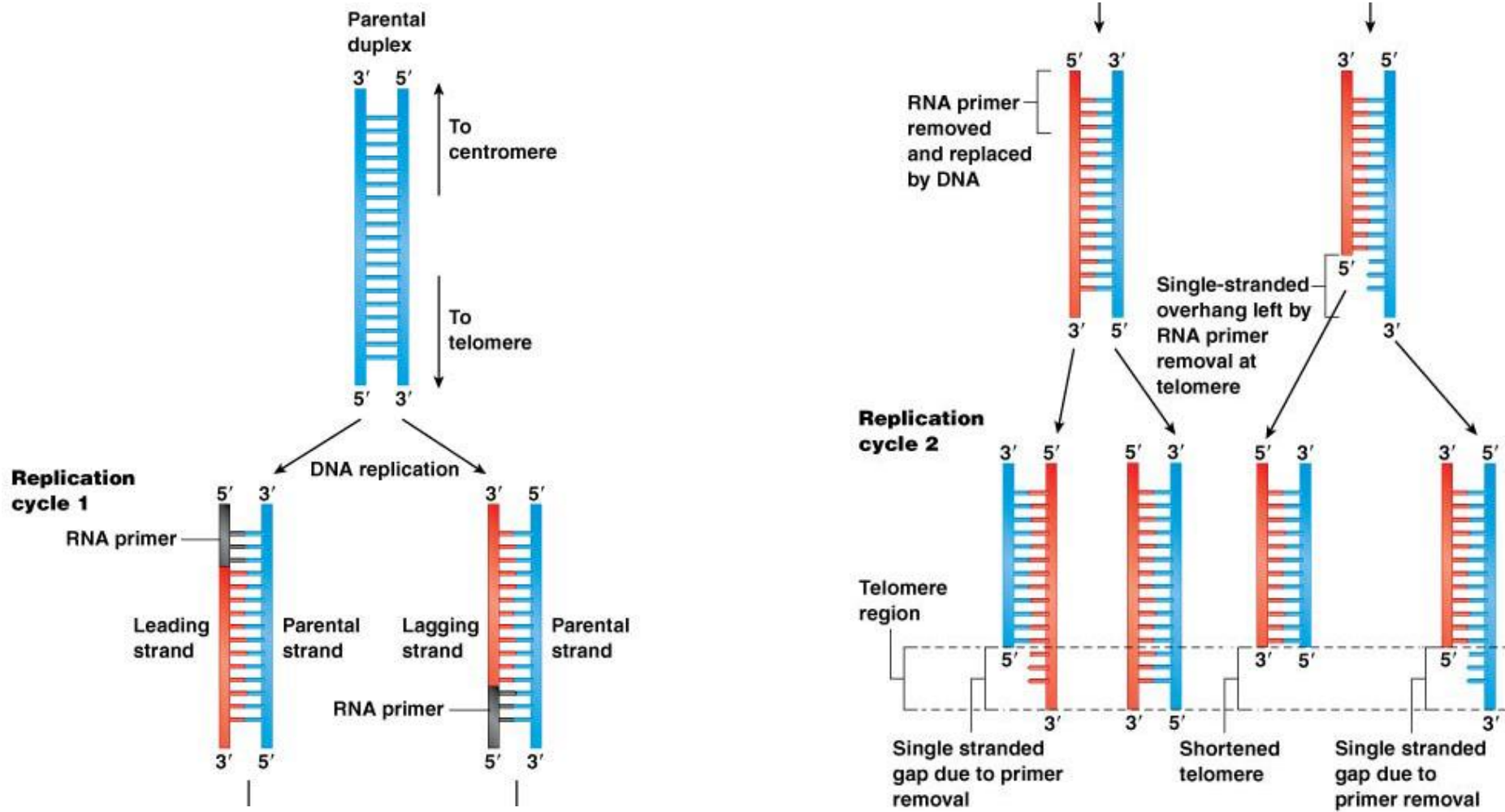
La hebra líder de un cromosoma lineal puede ser replicada hasta su final.

El requerimiento de un primer para la hebra retardada implica que éstas no pueden ser completamente replicadas hasta su final.

Este problema es resuelto con la presencia de secuencias repetitivas al final de los cromosomas. Estas secuencias se conocen como **telomeros**.

Estas secuencias repetitivas garantizan que un problema al final del proceso no afecte a genes con una función vital.

Pérdida de ADN en los telómeros



Importancia de la actividad de la Telomerasa

Los ratones que son homocigóticos para la pérdida de la función de *TERT* (telomerase reverse transcriptase) que codifica la telomerasa, presentan defectos en su desarrollo.

Los defectos son observados por primera vez en la cuarta y quinta generación debido a la pérdida de telómeros en cada generación.

Para la cuarta o quinta generación el acortamiento de los cromosomas es crítico y la apoptosis (muerte celular) es inducida.

Telómeros, envejecimiento y cáncer

La longitud de los telómeros es importante para la estabilidad del cromosoma, la longevidad de la célula y el éxito reproductivo.

La telomerasa está activa en las células de las líneas germinales (e.g. gametocitos) y en algunas células madres de los eucariotas.

Las células somáticas diferenciadas, y las células en cultivo, prácticamente no poseen actividad de la telomerasa. Estos tipos celulares tienen tiempos de vida relativamente cortos.

7.5 Molecular Genetic Analytical Methods Make Use of DNA Replication Processes

- Molecular biologists have used their understanding of DNA replication to develop new methods of molecular analysis
- Two widely used methods include *polymerase chain reaction (PCR)* and *dideoxynucleotide DNA sequencing*

The Polymerase Chain Reaction

- The **polymerase chain reaction (PCR)** is an automated version of DNA replication that produces millions of copies of a short target DNA segment
- PCR has numerous applications
- PCR reactions are carried out in small volumes (less than 50 μL)

Components of PCR

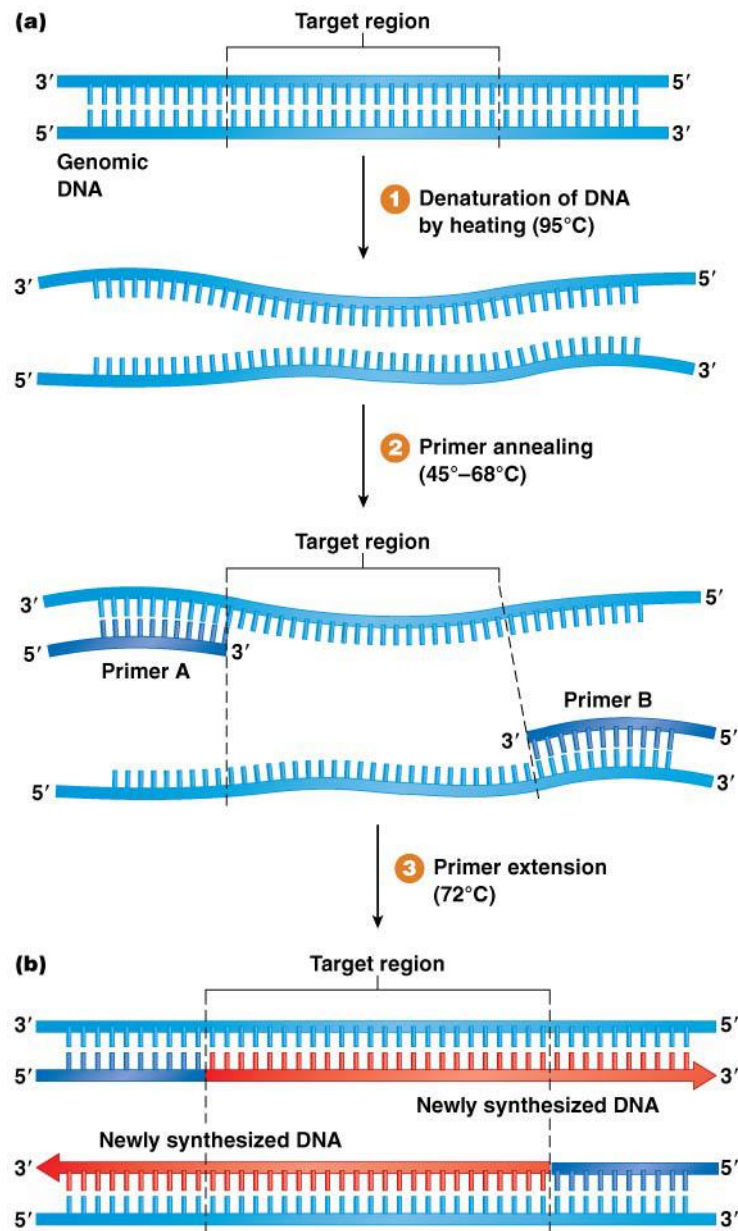
- PCR requires:
 - A double-stranded DNA template containing the target sequence to be amplified
 - A supply of the four DNA nucleotides
 - A heat-stable DNA polymerase
 - Two different single-stranded DNA primers
 - A buffer solution
- The most commonly used DNA polymerase, *Taq*, is isolated from *Thermus aquaticus*, which occurs naturally in hot springs

The Process of PCR

- PCR uses two DNA sequences called **PCR primers** that provide a starting point for *Taq* polymerase to add nucleotides
- The PCR primers define the 5' and 3' boundaries of the replication products
- PCR is composed of three steps that result in exponential amplification of large numbers of the target DNA

Steps of PCR

1. *Denaturation*: the reaction is heated to $\sim 95^{\circ}\text{C}$ to denature the DNA into single strands
2. *Primer annealing*: the reaction temperature is reduced to $\sim 45\text{--}68^{\circ}\text{C}$ to allow primers to hybridize to their complementary sequences in the target DNA
3. *Primer extension*: the reaction temperature is raised to 72°C to allow *Taq* polymerase to synthesize DNA



First cycle completed. Up to 35 additional cycles double the amount of replicated DNA from the target region in each cycle.

Limitations of PCR

- Some knowledge of the target DNA sequences is required in order to determine primer sequences
- Amplification products longer than 10 to 15 kb are difficult to produce
- Despite the limitations, PCR is a practical way to obtain large quantities of DNA from a particular gene for molecular analysis

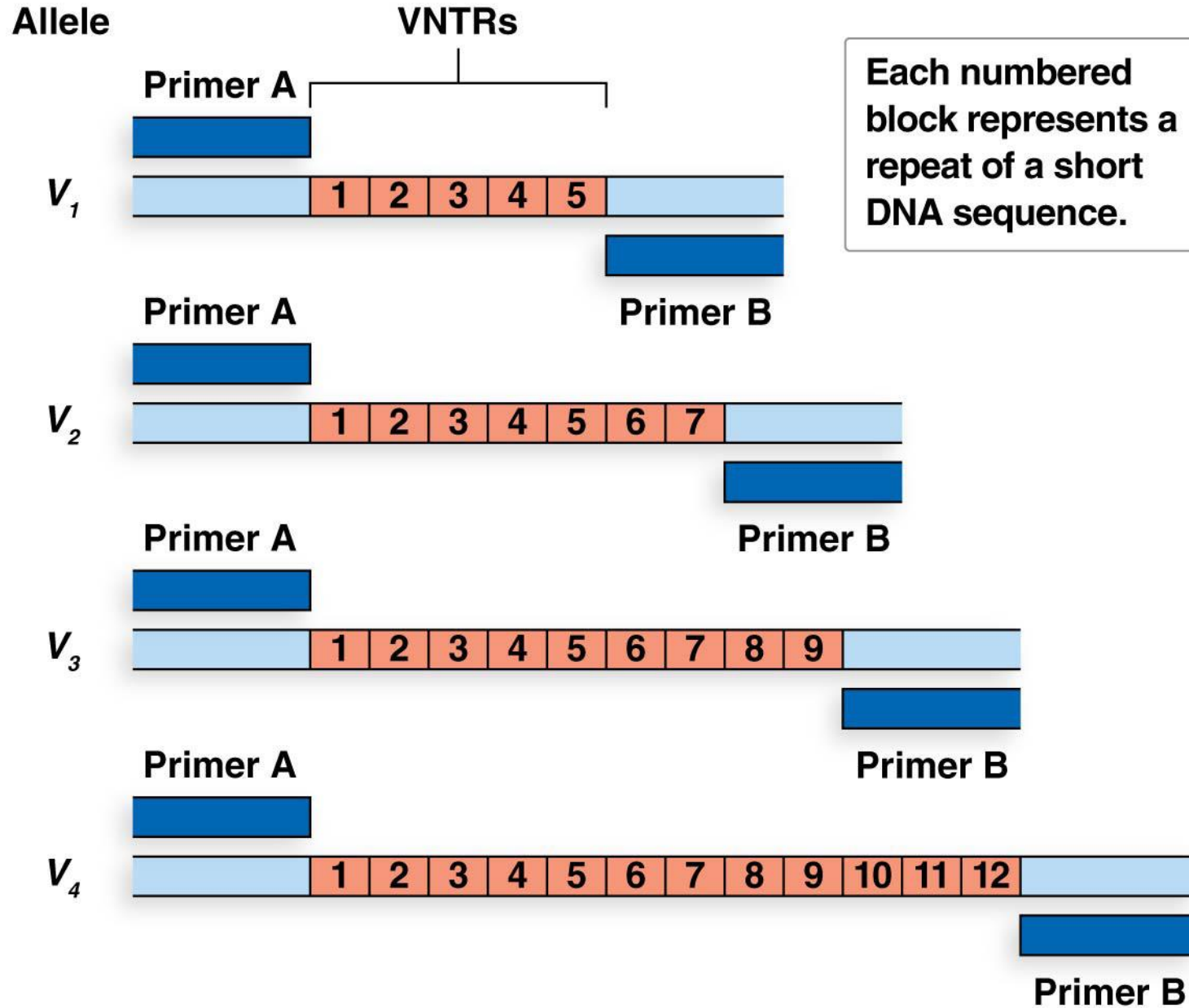
Separation of PCR Products

- Amplified DNA fragments are separated from the rest of the reaction mixture by gel electrophoresis and visualized by ethidium bromide staining
- PCR product sizes are measured in base pairs (bp)
- Differences in the size of DNA amplified by a pair of primers are related to the amount of DNA between the primers

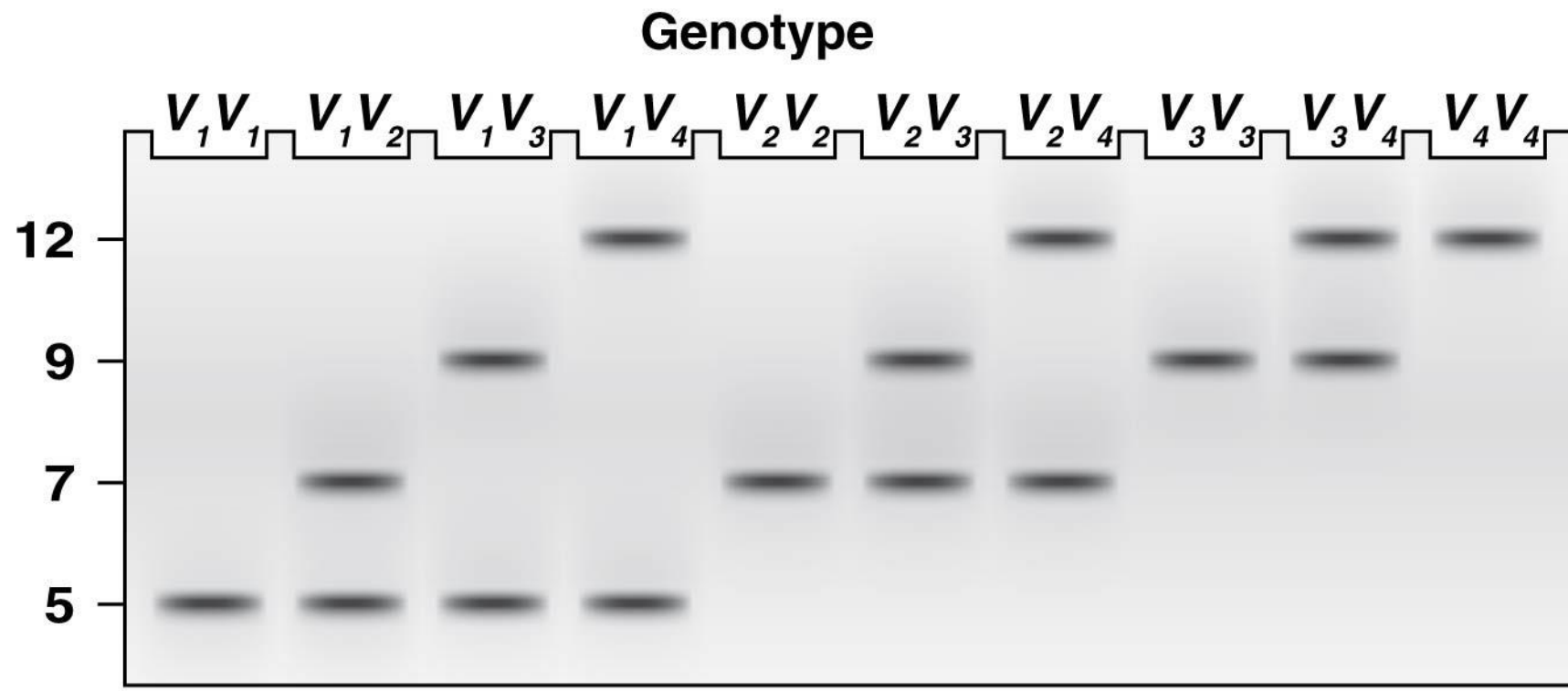
Variable Number Tandem Repeats

- Variable number tandem repeats (VNTRs) are used as a type of genetic marker
- These have variable numbers of repeats of DNA of up to 20 bp in length; they are also called short tandem repeat polymorphisms (STRPs)
- VNTRs are inherited, as are other types of alleles, and can be detected through PCR

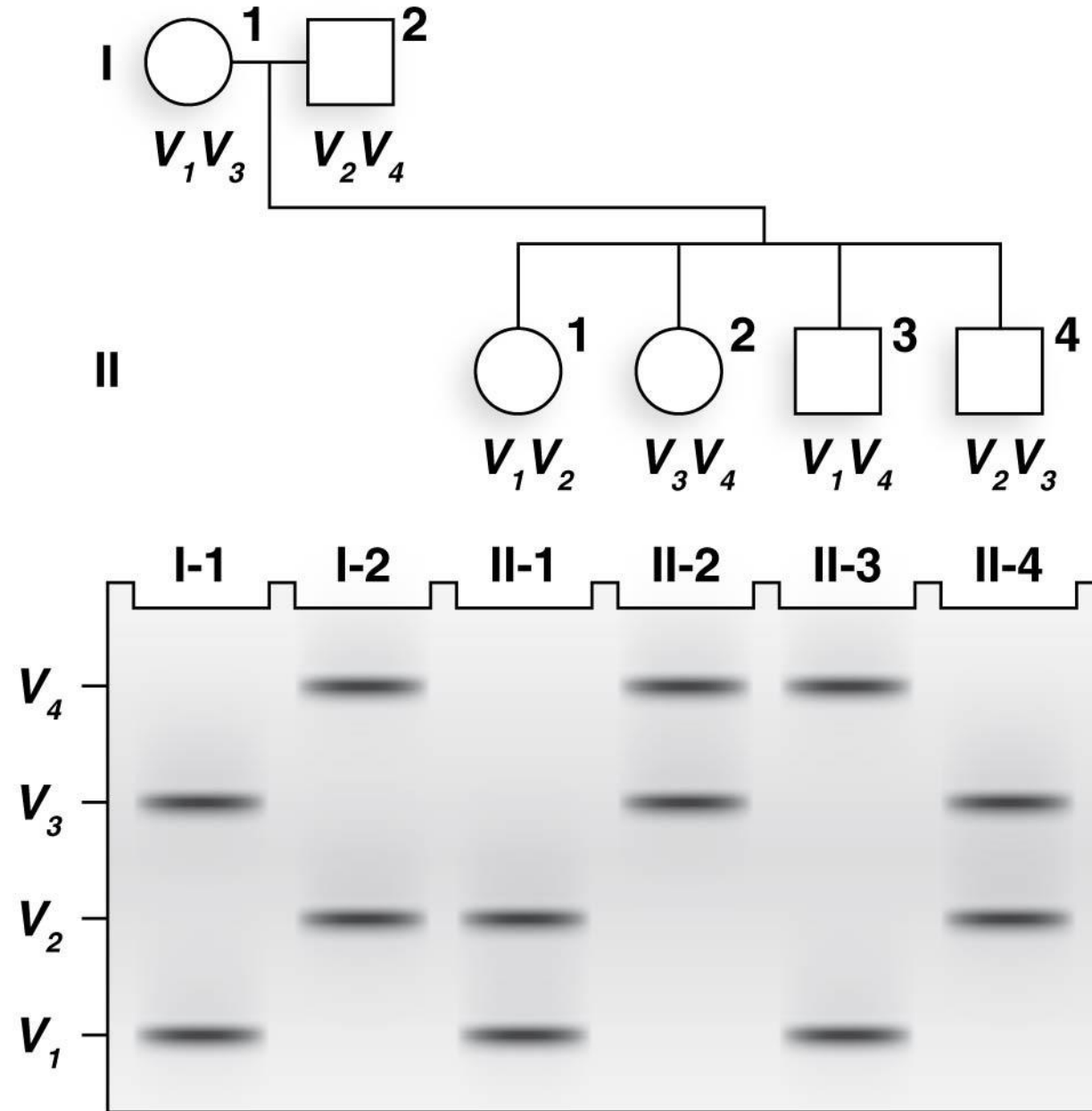
(a) Each allele produces a PCR fragment of a different length.



(b) VNTR band patterns



(c) Inheritance of VNTR variation



Dideoxynucleotide DNA Sequencing

- The ultimate description of a DNA molecule is its precise sequence of bases
- The first DNA-sequencing protocols were developed by Maxam and Gilbert, and another by Sanger in 1977
- The Sanger (dideoxynucleotide) method was most amenable to automation and is the method of choice today

Sanger Sequencing

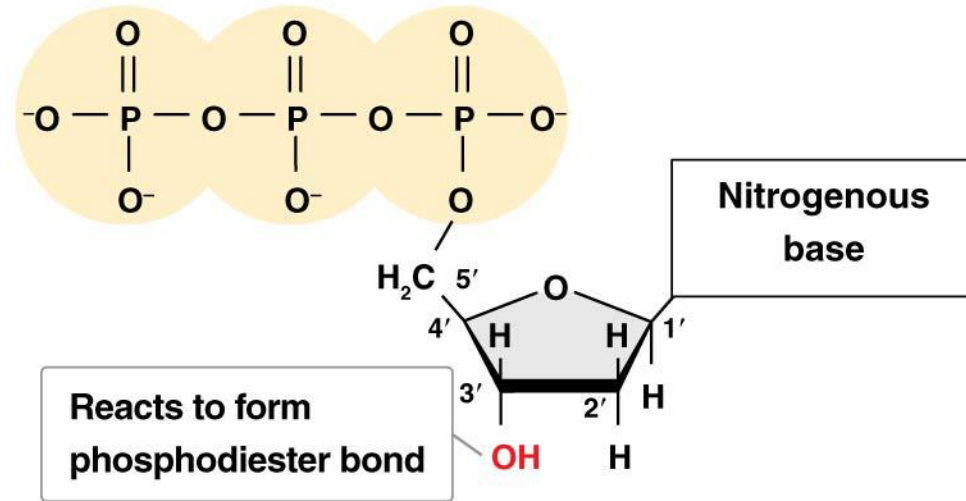
- **Dideoxynucleotide DNA sequencing (dideoxy sequencing)** uses DNA polymerase to replicate new DNA from a single-stranded template
- The four standard deoxynucleotide bases (dNTPs) are present in large amounts
- Each reaction contains a small amount of one **dideoxynucleotide (ddNTP)**, which lacks a 3'-OH group

The Principle of Sanger Sequencing

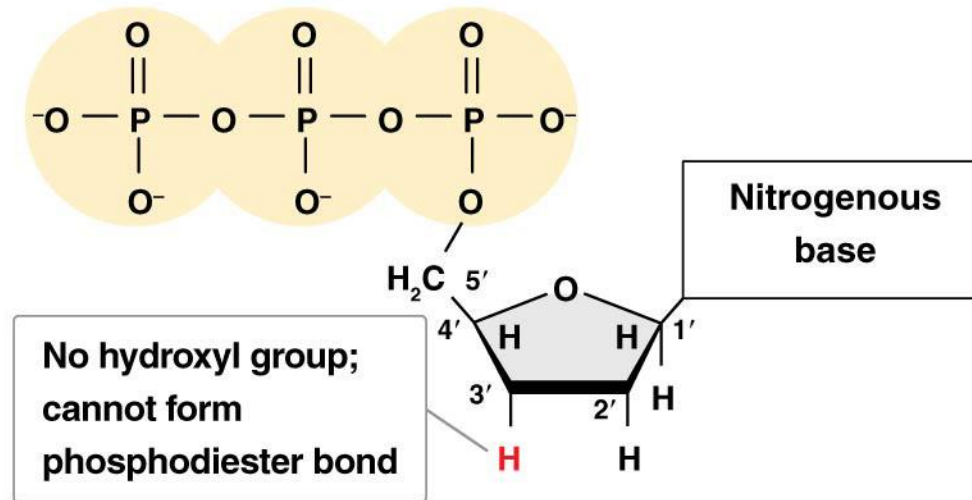
- Whenever a ddNTP is incorporated into the product DNA molecule, replication ceases
- A separate reaction is carried out for A, T, G, and C, using the corresponding small amount of ddNTP
- Each reaction tube produces a series of partial DNA molecules, each of which ends with that nucleotide
- All four reactions must be run side by side on a gel in order to determine the complete sequence

(a)

Chemical structure



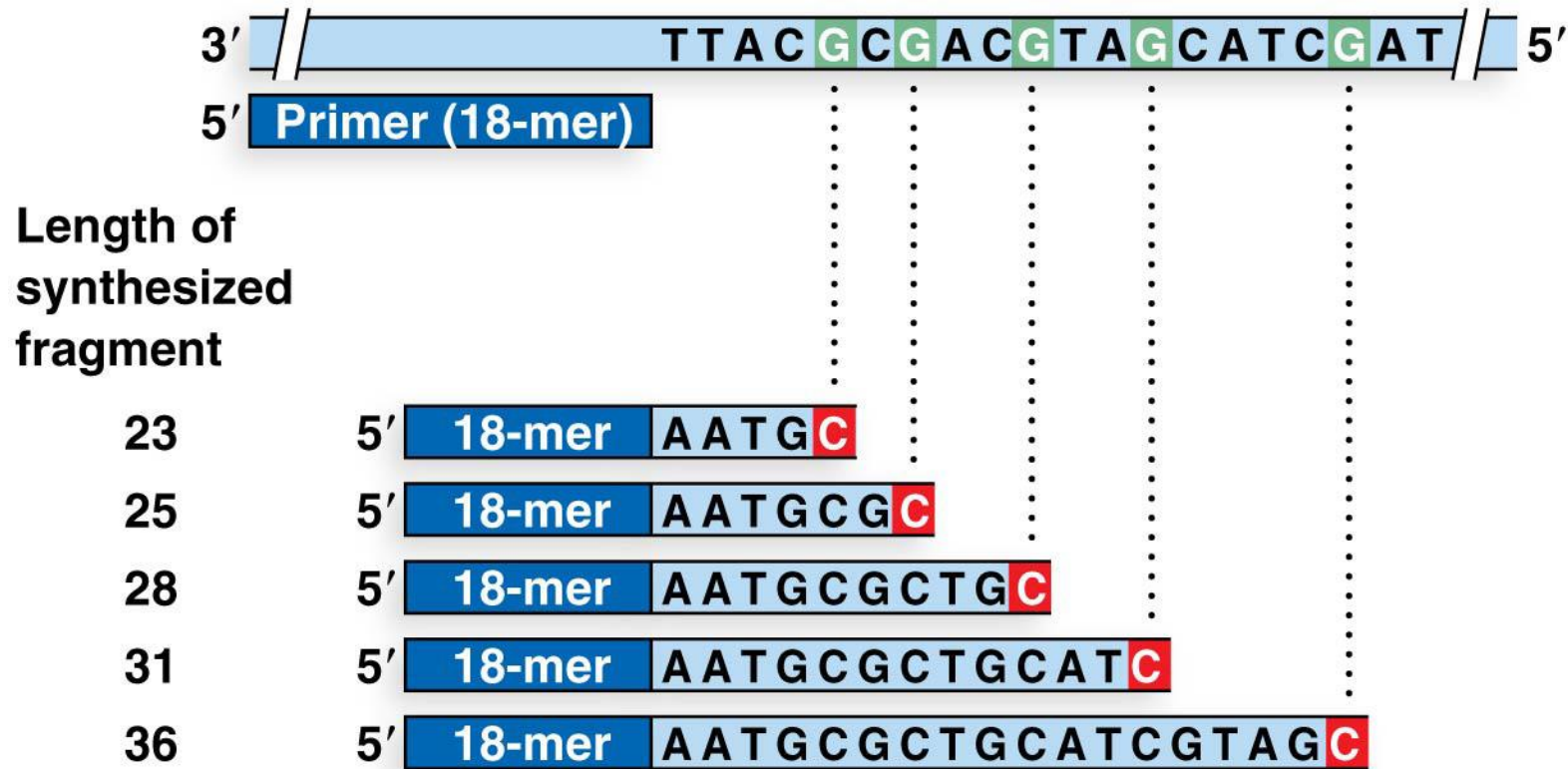
Deoxynucleotide triphosphate (dNTP)



Dideoxynucleotide triphosphate (ddNTP)

(a) ddCTP reaction (“C” lane)

Incorporation of dCTP allows the chain to continue growing, but incorporation of ddCTP terminates chain elongation.



Partial replication products terminate at each cytosine of the chain due to the incorporation of ddCTP.

(b) ddGTP reaction (“G” lane)

**Length of
synthesized
fragment**

**Partial
replication
products**

22

5' **18-mer** AAT**G**

24

5' **18-mer** AATGC**G**

27

5' **18-mer** AATGCGCT**G**

32

5' **18-mer** AATGCGCTGCATC**G**

35

5' **18-mer** AATGCGCTGCATCGTAG**G**

(c) ddTTP reaction (“T” lane)

**Length of
synthesized
fragment**

**Partial
replication
products**

21	5'	18-mer	A A T
26	5'	18-mer	A A T G C G C T
30	5'	18-mer	A A T G C G C T G C A T
33	5'	18-mer	A A T G C G C T G C A T C G T
38	5'	18-mer	A A T G C G C T G C A T C G T A G C T

(d) ddATP reaction (“A” lane)

Length of synthesized fragment

Partial replication products

19	5'	18-mer	A
20	5'	18-mer	AA
29	5'	18-mer	AATGCGCTGCA
34	5'	18-mer	AATGCGCTGCATCGTA
38	5'	18-mer	AATGCGCTGCATCGTAGCTA

Visualization of DNA Sequence

- After the reactions are complete, the reactions are run side by side on a gel
- The bands shown in the autoradiograph are visible because the primers that began each fragment were labeled with radioactive isotopes (end-labeling)
- The shortest bands are the DNA products closest to the primer and these travel fastest on the gel; the gel is read from the bottom up, all four lanes together



3' 5'

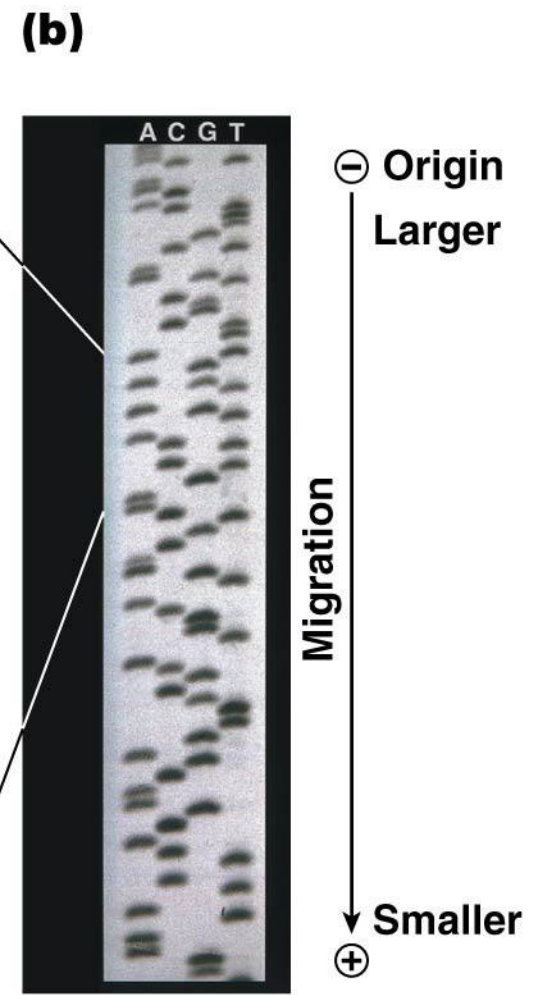
A T C G A T G C T A C C G T C G C G T A A

5' T A G C T A G A G C A G C A T T

Primer

Inferred strand

Sequenced strand from autoradiograph



A T G A G T A G T A C T C T G A A

Autoradiograph of a sequencing gel

Automated DNA Sequencing

- Manual dideoxy sequencing is labor intensive
- Automated DNA sequencing has largely supplanted manual dideoxy sequencing
- Automated sequencing and computational software and hardware can assemble genomic data at a rate of 10,000 to 20,000 bp per hour

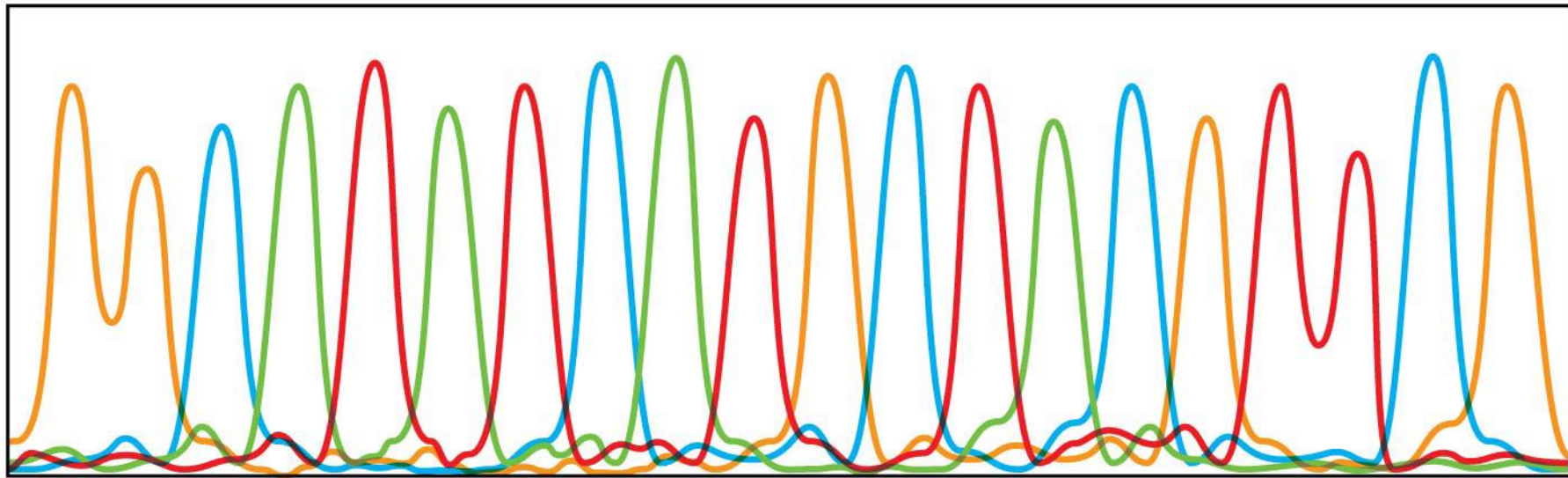
New DNA-Sequencing Technologies

- Next-generation sequencing ascertains the sequence of a single DNA strand by complementary strand synthesis, detecting which nucleotide is added at each step
- The sample is broken into double-stranded fragments
- The fragments are denatured and annealed to beads

Next-Generation Sequencing (continued)

- A multi-step process leads to PCR amplification
- Further steps involving nucleotides tagged with light-emitting molecules yields a profile of the nucleotide sequence
- Next-generation sequencing identifies the sequence of a DNA strand “by synthesis” rather than by the chain termination method of dideoxy sequencing

A A T G C G C T G C A T C G T A C C T A



FIN