

Секвенирование посредством **терминирования
растущей цепи.**

Ака Циклосеквенирование.

Ака Один из методов секвенирования **по Сенгеру.**

Туранов С.В.

ННЦМБ ДВО РАН

Лаб. Молекулярной систематики

Осень 2018

Для чего применяется:

- получение последовательностей небольших (~ до 1500 п.о.) фрагментов генома
- секвенирование небольших геномов (митохондриальный геном позвоночных) через перекрывание фрагментов

Для циклосеквенирования необходимы:

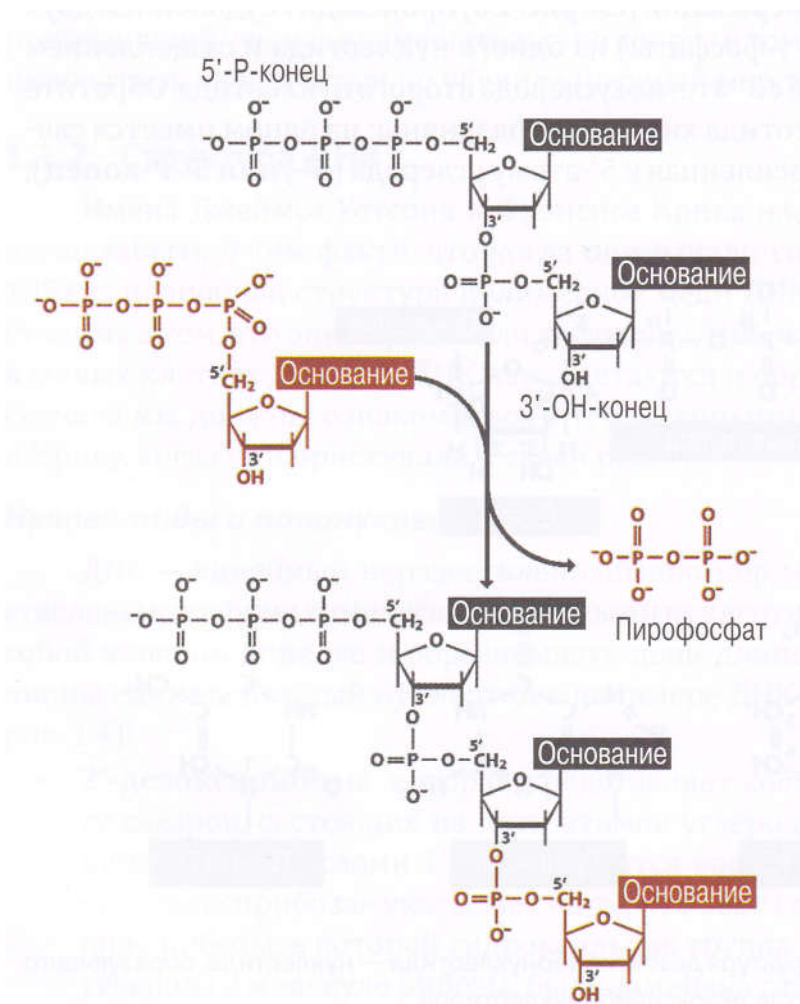
1. Набор BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit. (~ 90000 руб на 100 реакций).
2. Очищенные **ампликоны** интересующего нас участка генома.
3. Праймеры (чаще всего используются те, с помощью которых нарабатывались **ампликоны**).
4. Вода (деионизированная).
5. Амплификатор.
6. Пластик (наконечники, пробирки).



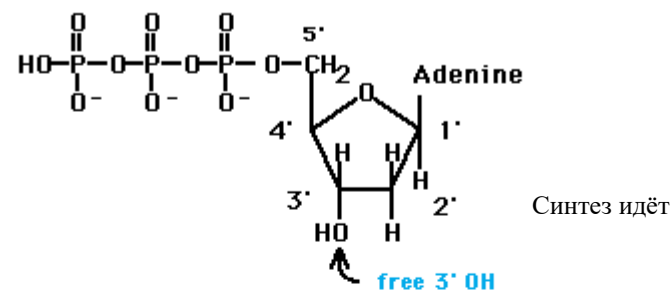
Очистка ампликонов:

1. Добавляем 2-3 объёма 95% этанола.
2. Интенсивно встряхиваем.
3. Центрифугируем (20-35 мин на максимальных оборотах ~ 13000).
4. Сливаем надосадочную жидкость.
5. Два раза промываем осадок 70% этанолом с центрифугированием.
6. Подсушиваем осадок и растворяем в 10-25 мкЛ деионизированной воды либо буфера для хранения ДНК.

Химизм секвенирования посредством терминирования растущей цепи

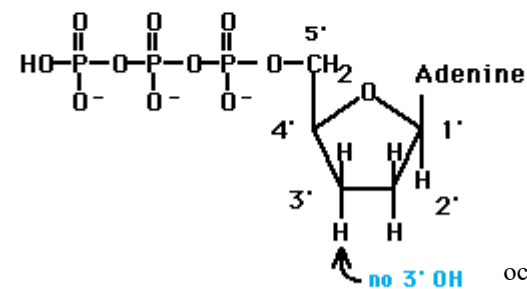


Синтез (рост цепи) полинуклеотида в направлении 5'→3'



Синтез идёт

dATP

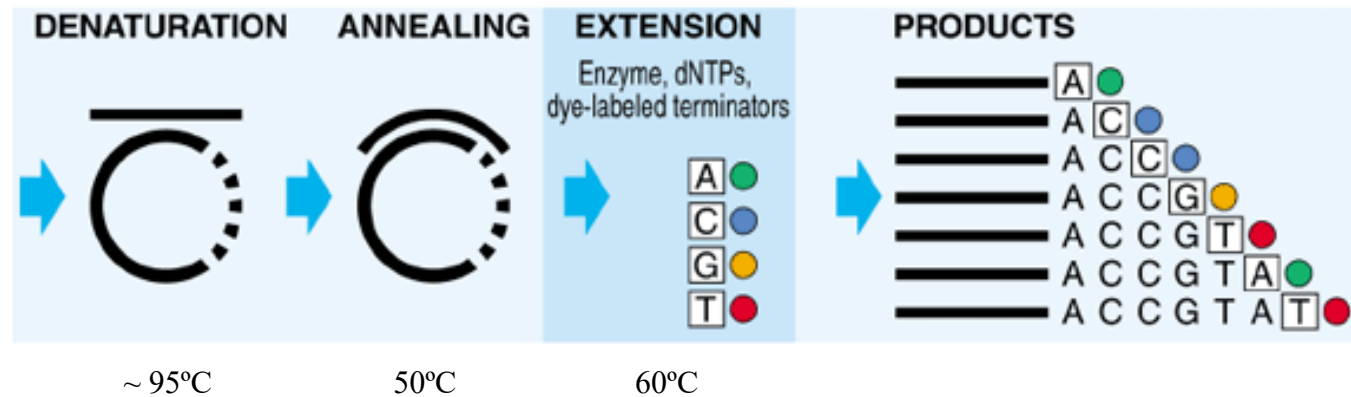


Синтез
останавливается

ddATP

Отличие дезоксиаденинтрифосфата от
dd дезоксиаденинтрифосфата

Химические особенности секвенирования посредством *терминирования растущей цепи*

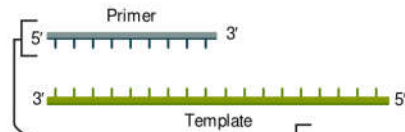


Набор для секвенирования
помимо обычных фосфатов
содержит *дидезокси*фосфаты
с флуоресцирующей меткой
индивидуального цвета для
каждого из 4 нуклеотидов.

Капиллярный электрофорез

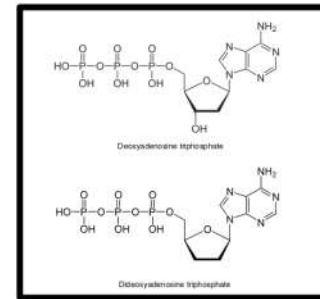
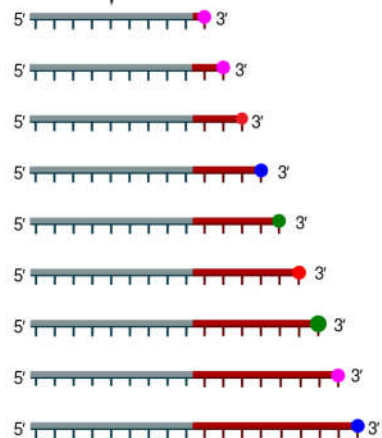
① Reaction mixture

- ▶ Primer and DNA template
- ▶ DNA polymerase
- ▶ ddNTPs with flouorochromes
- ▶ dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, and dTTP)

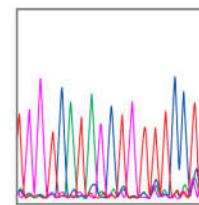
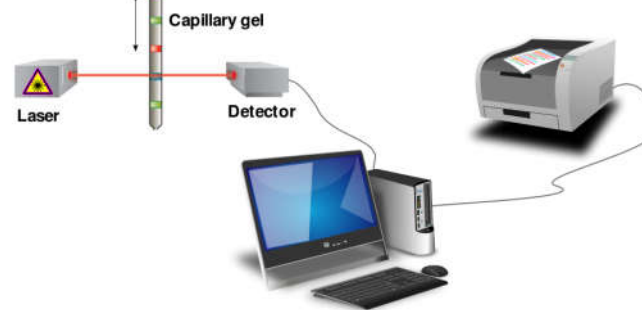


ddNTPs
ddTTP (red)
ddCTP (blue)
ddATP (green)
ddGTP (magenta)

② Primer elongation and chain termination



③ Capillary gel electrophoresis separation of DNA fragments



④ Laser detection of flouorochromes and computational sequence analysis

Капиллярный электрофорез

DNA Fragments with Dye Terminators
(Smaller fragments pass through the capillary first)

A A T G G A G G T T G G T

A A T G G A G G T T G G

A A T G G A G G T T G

A A T G G A G G T T

A A T G G A G G T

A A T G G A G T

A A T G G A G

A A T G G A

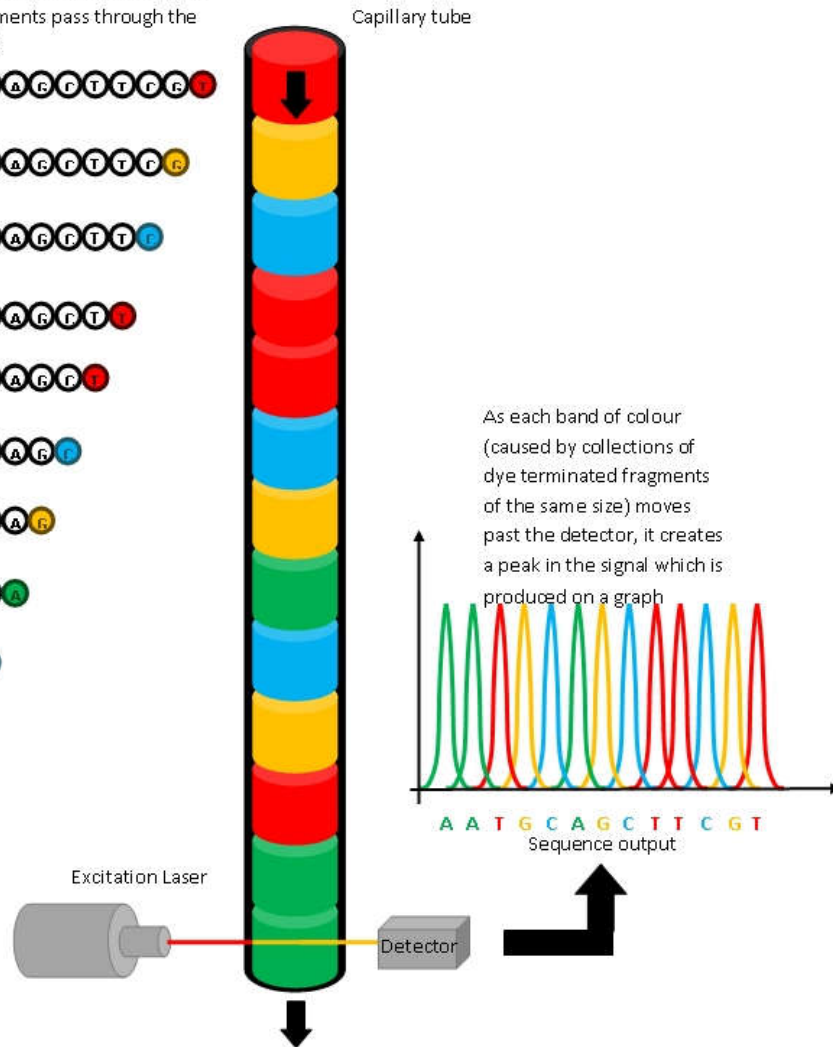
A A T G T

A A T G

A A T

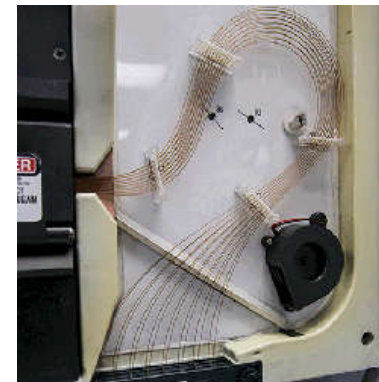
A A

A

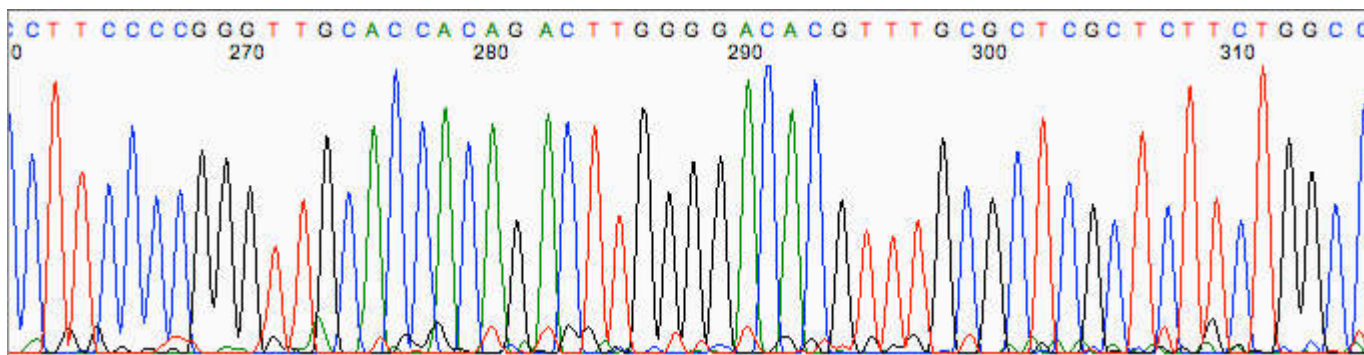


А ещё лучше посмотреть ролик

(<https://www.youtube.com/watch?v=ezAefHhvecM&url=http://video.google.com/videosearch?hl=en&q=DNA%20sequencing&um=1&ie=UTF-8&sa=N&tab=vv>)



Что мы получаем



Литература:

Ребриков Д.В., Коростин Д.О., Шубина Е.С., Ильинский В.В. NGS: высокопроизводительное секвенирование. — М. : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2014.