

**Секвенирование посредством **терминирования**  
растущей цепи.**

*Aka* Циклосеквенирование.

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

Туранов С.В.

ННЦМБ ДВО РАН

Лаб. Молекулярной систематики

Осень 2016

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.

5'-P-конец

Основание

Основание

3'-OH-конец

Основание

Основание

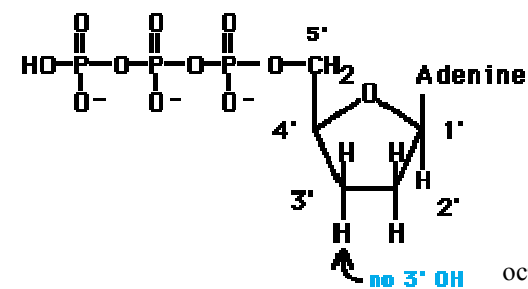
Пирофосфат

Основание

Основание

Chemical structure of ATP (Adenosine Triphosphate) showing the adenine base, ribose sugar, and three phosphate groups. The 3' carbon of the ribose is labeled "free 3' OH" with an arrow pointing to it.

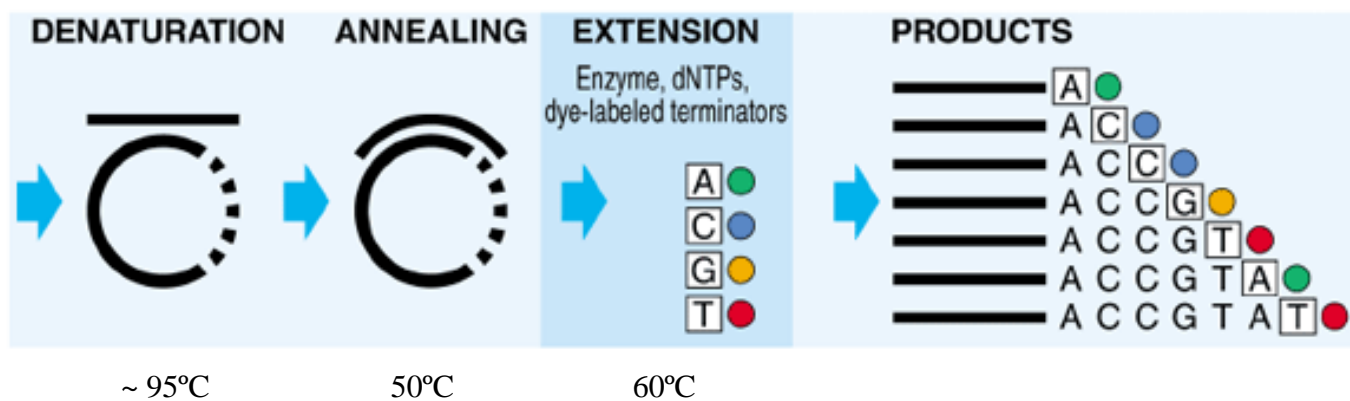
dATP



ddATP

Отличие дезоксиаденинтрифосфата от *ди*дезоксиаденинтрифосфата

## Химизм секвенирования посредством *терминирования растущей цепи*

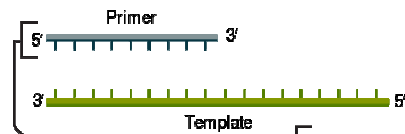


Набор для секвенирования помимо обычных фосфатов содержит **дидезоксифосфаты** с флуоресцирующей меткой индивидуального цвета для каждого из 4 нуклеотидов.

# Капиллярный электрофорез

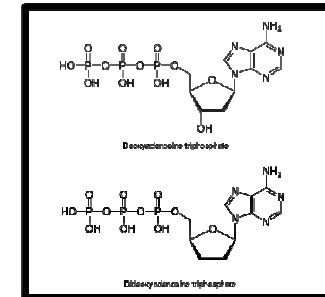
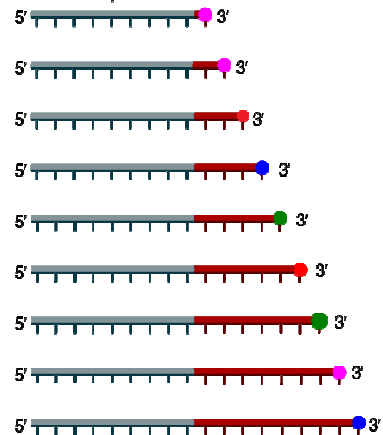
## ① Reaction mixture

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

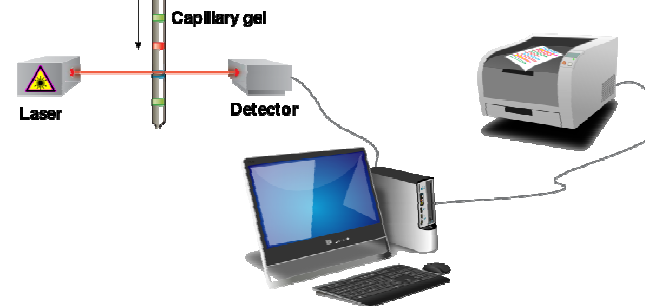


ddNTPs  
ddTTP (red)  
ddCTP (blue)  
ddATP (green)  
ddGTP (magenta)

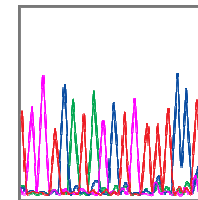
## ② Primer elongation and chain termination



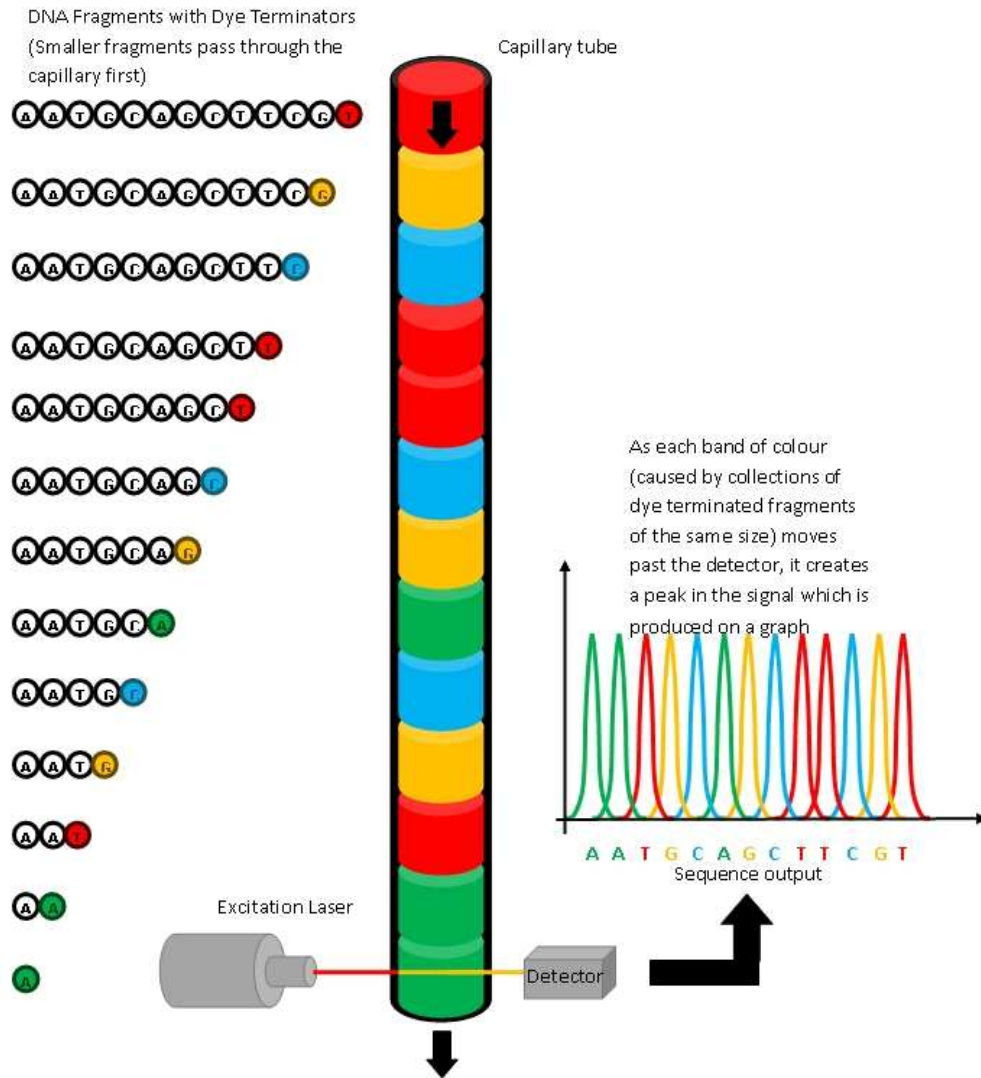
## ③ Capillary gel electrophoresis separation of DNA fragments



## ④ Laser detection of flouochromes and computational sequence analysis

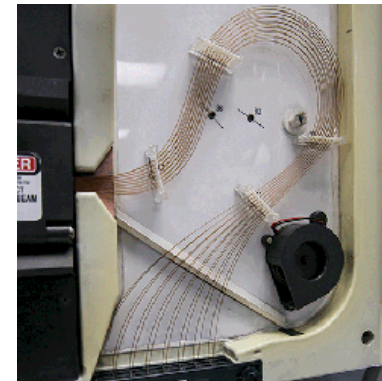


# Капиллярный электрофорез

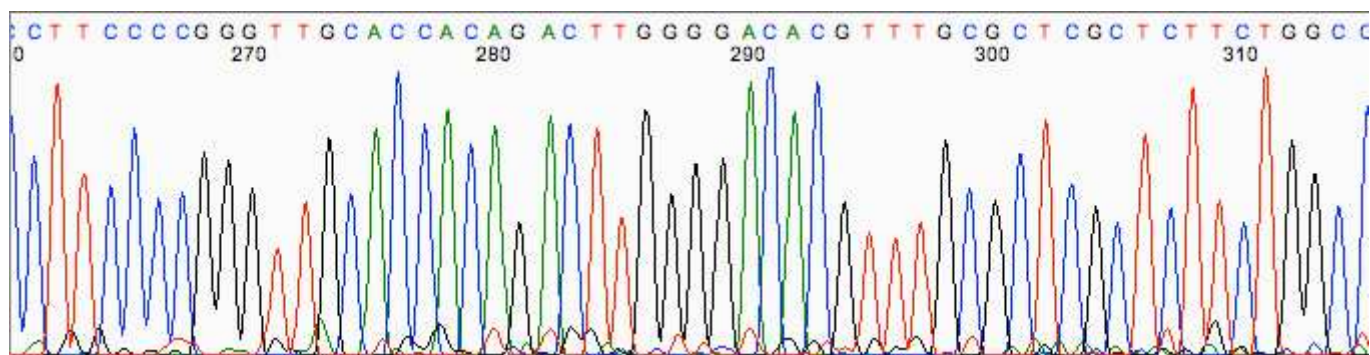


[А ещё лучше посмотреть ролик](https://www.youtube.com/watch?v=ezAefHhvecM&url=http://video.google.com/videosearch?hl=en&q=DNA%20sequencing&um=1&ie=UTF-8&sa=N&tab=wv)

(<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=wv>)



Что мы получаем





## **Литература:**

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