

Что такое секвенирование ДНК по методу Сенгера?

Секвенирование — это расшифровка точной первичной структуры ДНК. Методы расшифровки ДНК начали появляться в 70-х годах XX века. В начале все работы по секвенированию выполнялись специалистами вручную и были очень трудоемкими. Наиболее удобным для автоматизации оказался метод, предложенный Фредериком Сенгером.

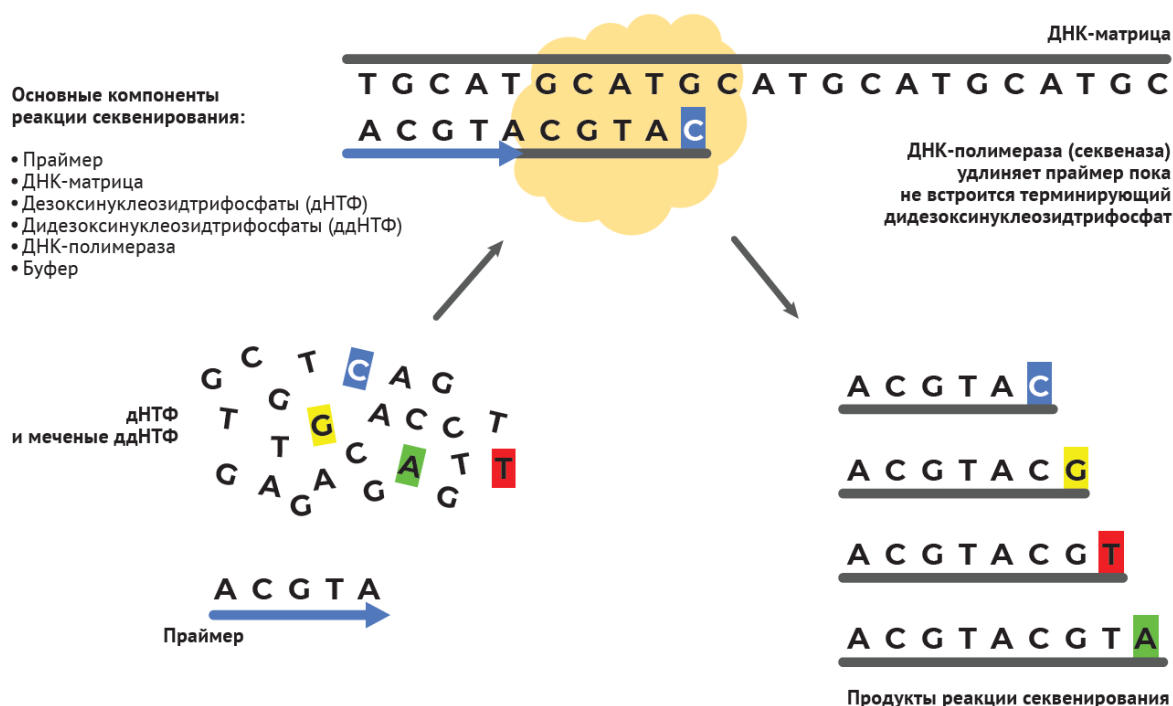


Рисунок 1. Принцип реакции секвенирования по Сенгеру.

В чем принцип современного метода секвенирования по Сенгеру?

Реакция секвенирования напоминает ПЦР (полимеразную цепную реакцию) с некоторыми особенностями: в пробирке происходит многократное термоциклирование реакционной смеси, в которой присутствуют ДНК матрица, ДНК-полимераза (секвеназа), буфер, дезоксинуклеотиды (dA, dT, dC, dG), один секвенирующий праймер, а также небольшое количество терминирующих дидезоксинуклеотидов (ddA, ddT, ddC, ddG), каждый из которых несет свою флуоресцентную метку.

Дидезоксинуклеотиды при встраивании терминируют удлинение секвенирующего праймера. Поэтому второе название метода — метод обрыва цепи. Механизм обрыва следующий: обычный нуклеотид имеет на 3'-конце гидроксильную группу, к которой полимераза присоединяет следующий нуклеотид. У дидезоксинуклеотида этой группы нет, поэтому, как только он встроился, синтез останавливается. Каждый из четырех типов дидезоксинуклеотидов мечен своим красителем. При стандартных условиях секвенирование проходит за 25-30 циклов. Каждый цикл состоит из трех этапов: денатурация, отжиг праймера, элонгация.

Что представляют собой продукты реакции? Это удлиненные копии секвенирующего праймера, оборванные в местах, в которых вместо обычных нуклеотидов случайным образом были встроены дидезоксинуклеотиды. Таким образом, если упорядочить полученные продукты реакции по длине, то соседние молекулы будут отличаться друг от друга на один нуклеотид. При этом цвет флуоресцентной метки подскажет нам тип нуклеотида (А, Т, Г или С), а длина продукта — его позицию в последовательности ДНК.

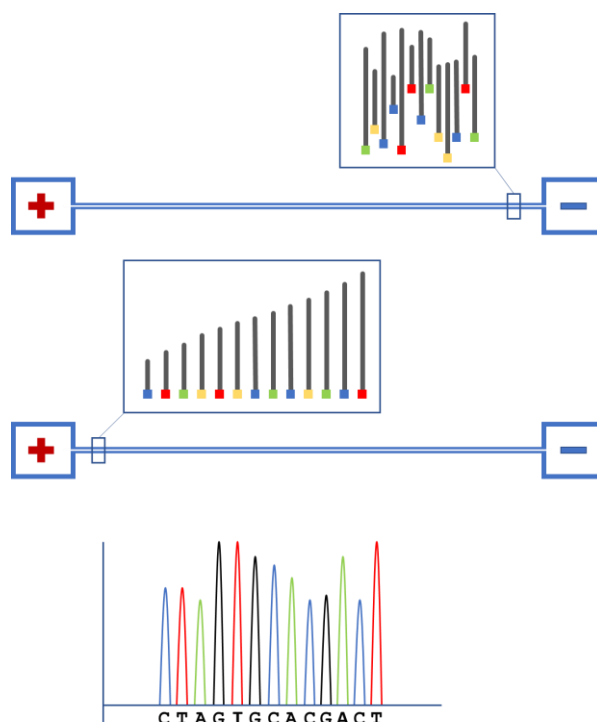


Рисунок 2. Анализ продуктов реакции секвенирования методом капиллярного электрофореза. Заряженные молекулы ДНК разделяются в полимере под воздействием электрического поля. Полимер работает как молекулярное сито: короткие фрагменты ДНК проходят между молекулами полимера быстрее, длинные — тормозятся.

Секвенирование ДНК – многоэтапный рабочий процесс

Для успешного протекания реакции секвенирования требуется большое количество матрицы (порядка 1,8 млрд копий на реакцию). Поэтому при расшифровке геномной ДНК для интересующего участка предварительно получают ампликон (продукт ПЦР). Затем проводят его очистку, оценивают качество и количество. После чего ампликон используют в качестве матрицы в реакции секвенирования. Продукты реакции секвенирования также очищают, а затем разделяют методом капиллярного электрофореза. Благодаря тому, что молекулы ДНК заряжены (из-за фосфатных групп они обладают отрицательным зарядом), их удобно разделять в полимере под воздействием электрического поля.

Когда разделенные продукты реакции секвенирования поочередно проходят через детектор, они подвергаются воздействию лазера. Лазер вызывает сигнал от флуоресцентных меток на дидезоксинуклеотидах в составе продуктов реакции. Получаемый сигнал обрабатывается и выводится на экран в виде чередующихся пиков электрофореграммы. Каждый пик соответствует нуклеотиду в последовательности ДНК.

В одном капилляре разделяется одна реакция секвенирования, что соответствует одному участку прочтения. Секвенирование ДНК по Сенгеру позволяет прочитывать области длиной до 1000 нуклеотидов. Это дает возможность поиска как известных, так и ранее неизвестных мутаций в этих регионах.

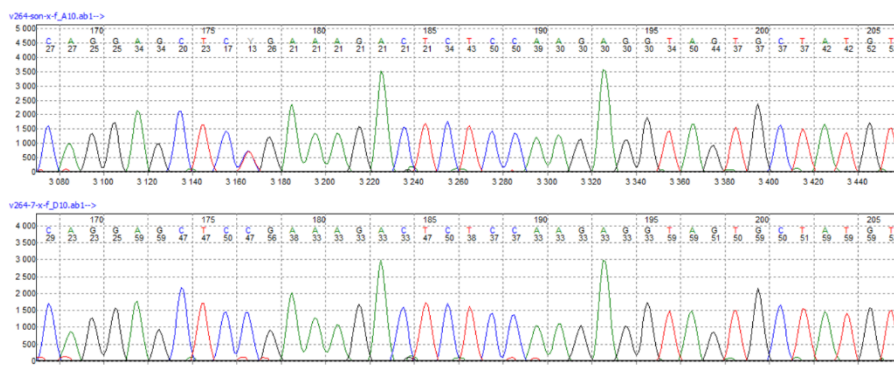


Рисунок 3. Результаты секвенирования на НАНОФОР 05. Полимер ПДМА-6, капилляры 36 см. Секвенирование локуса E, связанного с окрасом собак. Анализ образца в программе Mutation Surveyor®. Данные НАНОФОР 05 любезно предоставлены ветеринарной лабораторией ПОИСК (г.Санкт-Петербург).

Информация для заказа

Кат. номер	Название
EW-101	Набор реагентов «ColGen» для выделения ДНК из агарозного геля и реакционных смесей
SynMag Beads-10	Магнитные частицы для разделения ДНК по размерам «SynMag Beads», 10 мл
E-023-250	Набор реагентов для измерения концентрации двуцепочечной ДНК «СинКвант HS ДНК»
E-024-250	Набор реагентов для измерения концентрации двуцепочечной ДНК «СинКвант BR ДНК»
GenSeq-100	Набор реагентов для секвенирования ДНК по методу Сенгера «GenSeq-100»
SeqMag-200	Набор реагентов для очистки продуктов реакции секвенирования ДНК по Сенгеру «SeqMag-200»
DIFA-10	Деионизированный формамид для электрокинетической инъекции образцов

Реактивы доступны в различных фасовках.

Полный список наборов реагентов и расходных материалов ищите в нашем прайсе-листе на сайте www.syntol.ru



ООО «НПФ Синтол» | 127550, Москва, Тимирязевская, 42
т (495) 984-6993 многоканальный | syntol@syntol.ru