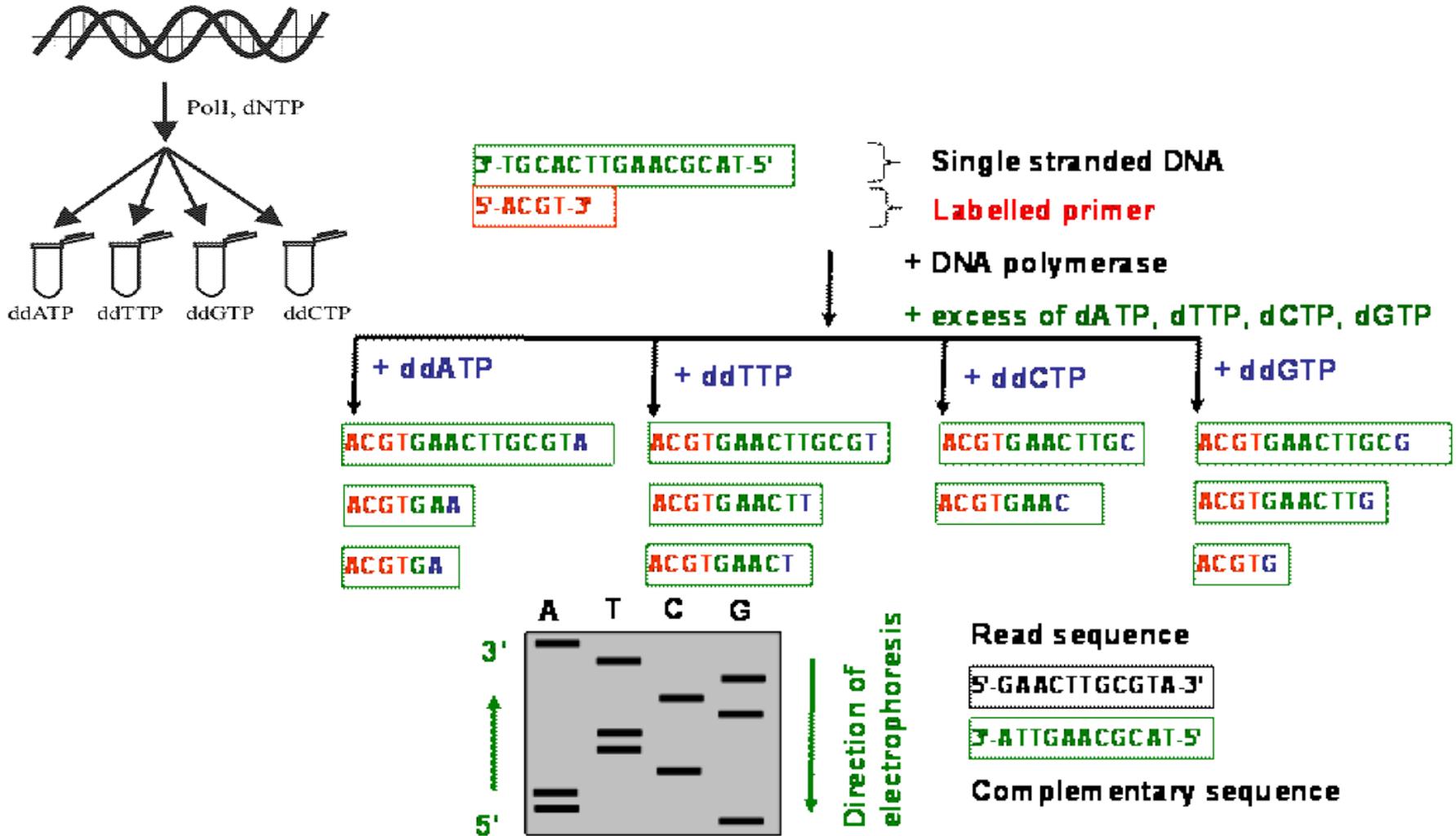


Практическая работа №3

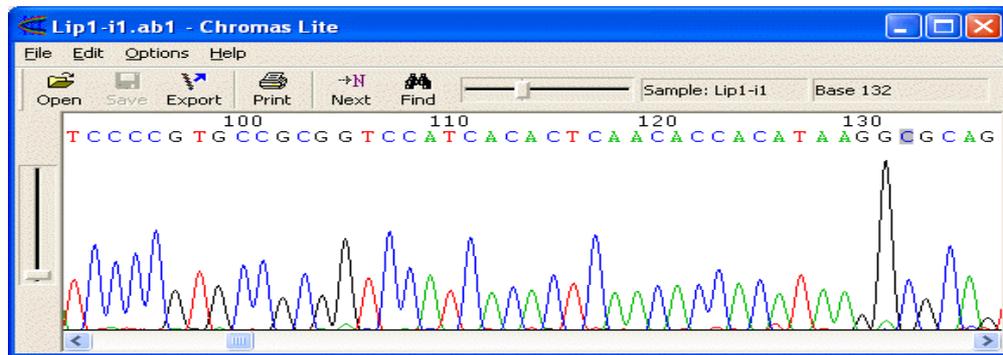
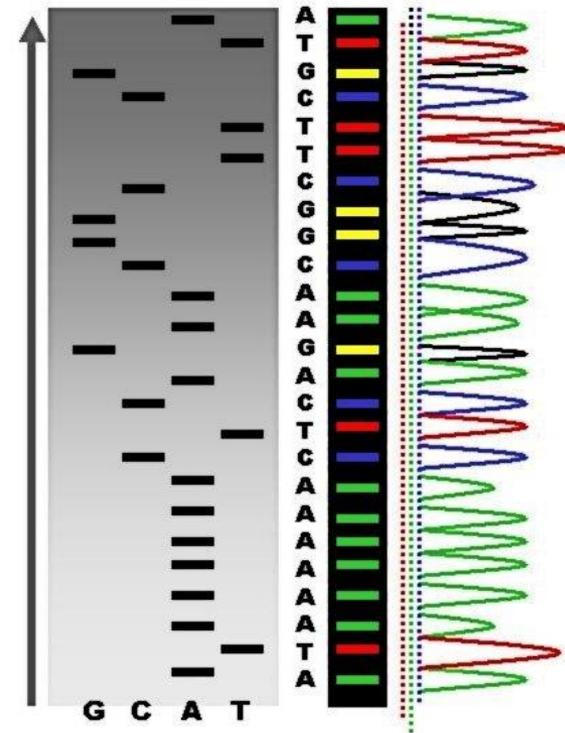
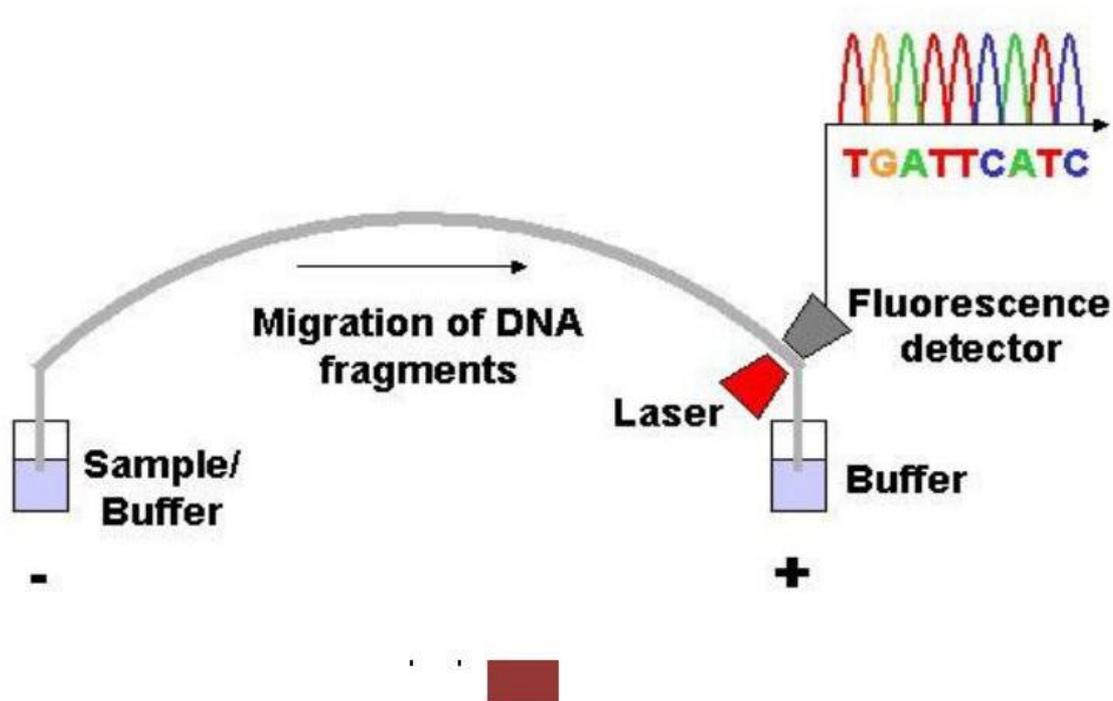
**Секвенирование - определение  
последовательности нуклеотидов**

# Метод Сенгера. Метод обрыва цепи. Метод терминирующих аналогов трифосфатов.



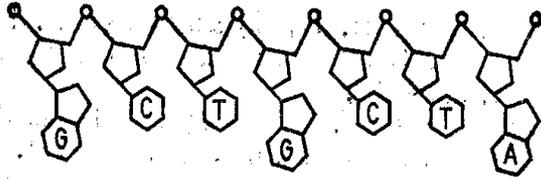
Sanger F., Niclein S., Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1977, v. 74, p. 5463

# Принцип работы автоматического секвенатора

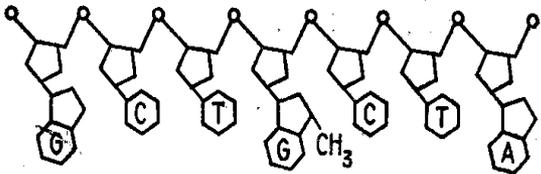


# Секвенирование ДНК по Максаму и Гилберту: метод химической деградации

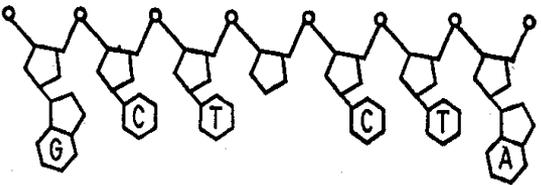
Фрагмент ДНК



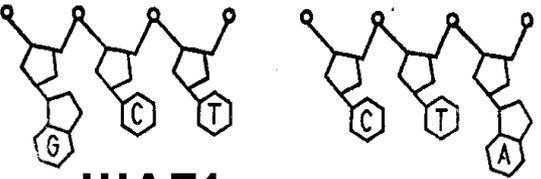
Модификация азотистого основания



Отщепление или замещение модифицированного основания



Разрыв сахаро-фосфатной цепи ДНК



## ШАГ 1

Модификация звеньев

ДНК с 5'-концевой <sup>32</sup>P меткой 5' <sup>32</sup>P Gp Cp Tp Gp Cp Tp Ap Gp Gp Tp Gp Cp Cp Gp Ap Gp C 3'

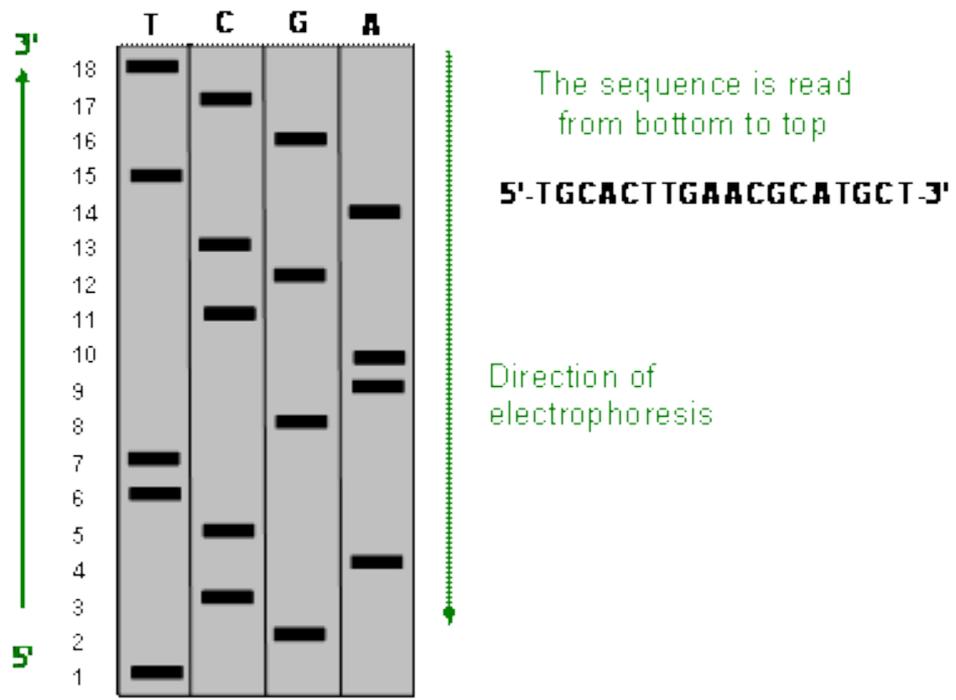
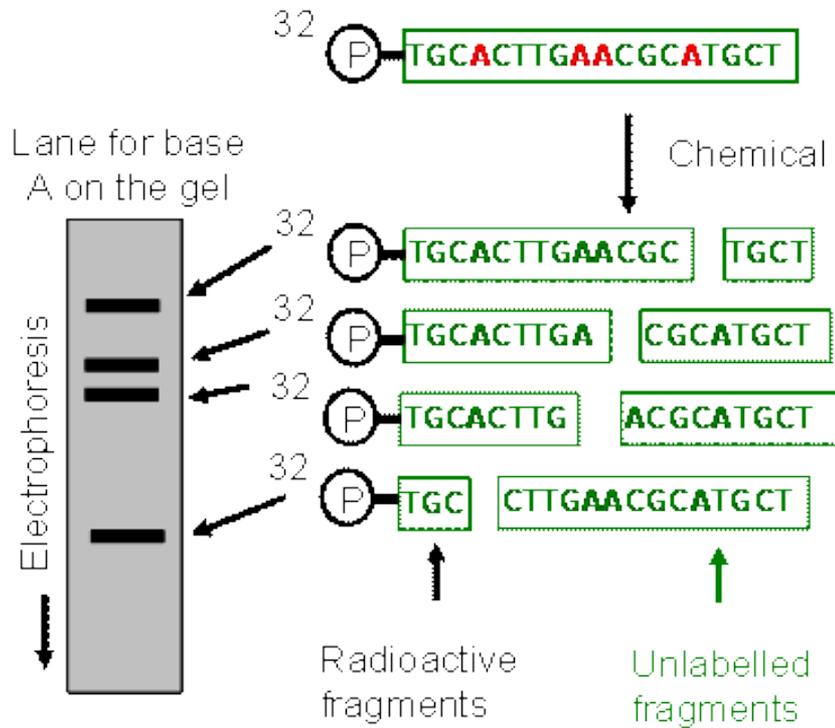
Положение гуаниловых звеньев G G G G G G

Продукты химической деградации

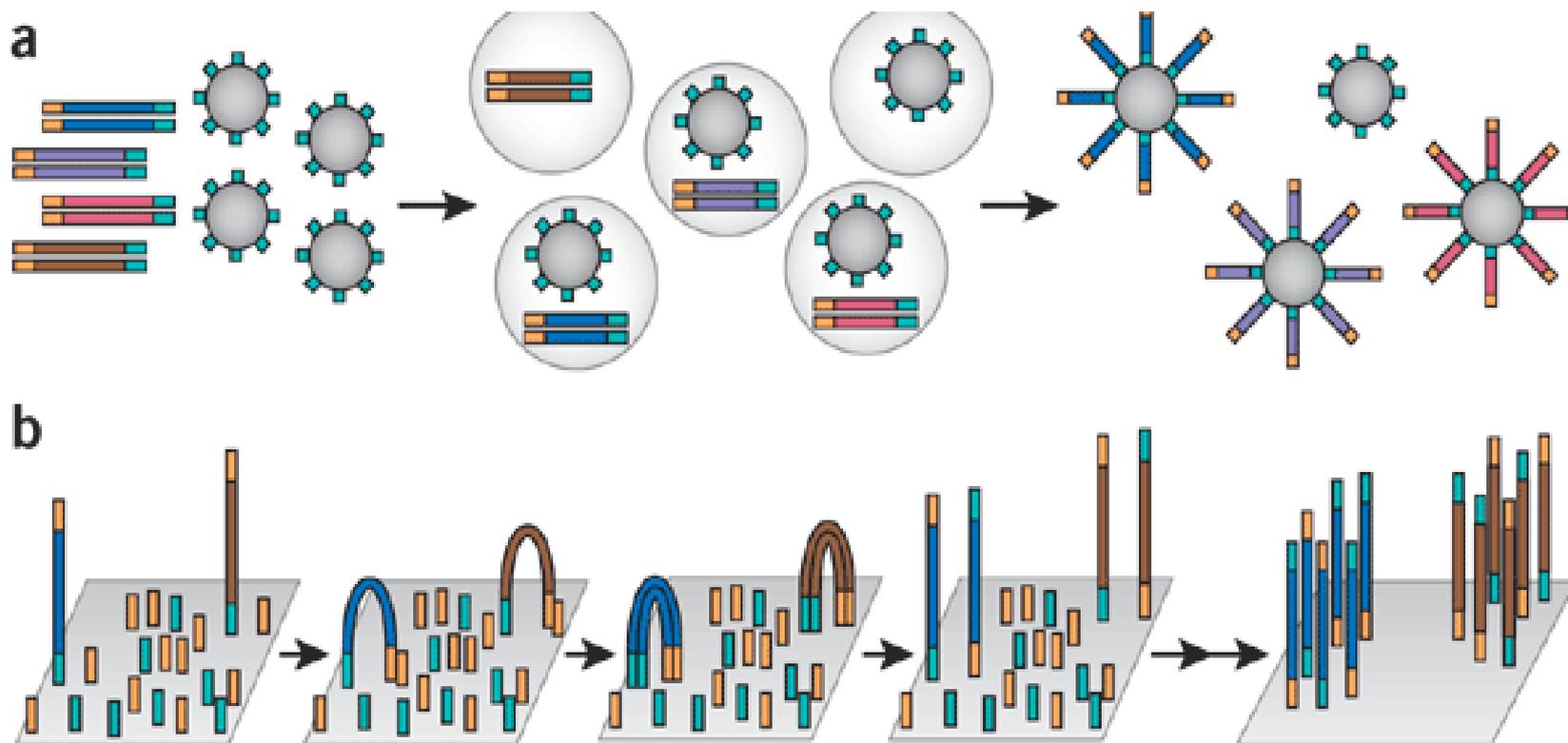
- <sup>32</sup>P
- <sup>32</sup>P Gp Cp Tp
- <sup>32</sup>P Gp Cp Tp Gp Cp Tp Ap
- <sup>32</sup>P Gp Cp Tp Gp Cp Tp Ap Gp
- <sup>32</sup>P Gp Cp Tp Gp Cp Tp Ap Gp Gp Tp
- <sup>32</sup>P Gp Cp Tp Gp Cp Tp Ap Gp Gp Tp Gp Cp Cp
- <sup>32</sup>P Gp Cp Tp Gp Cp Tp Ap Gp Gp Tp Gp Cp Cp Gp Ap
- <sup>32</sup>P Gp Cp Tp Gp Cp Tp Ap Gp Gp Tp Gp Cp Cp Gp Ap Gp C

## ШАГ 2

Химическая деградация



# NGS-секвенирование



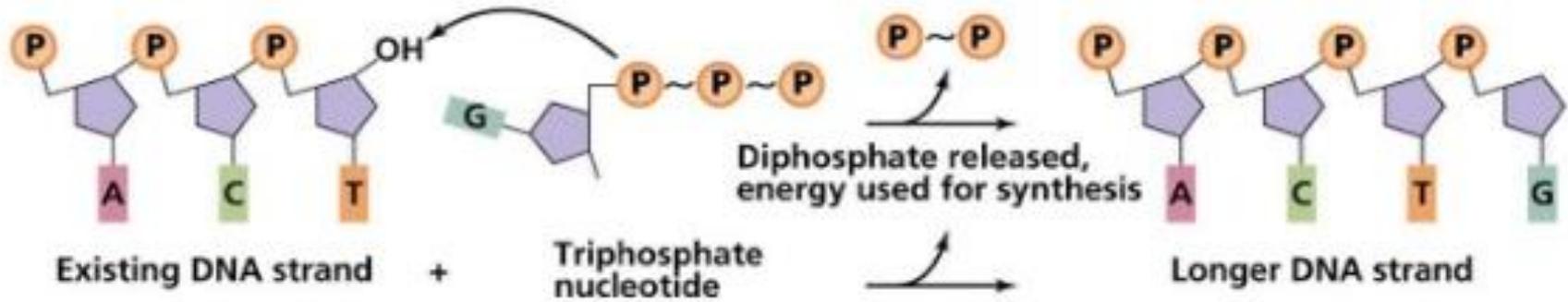
Выращивание колоний ДНК посредством ПЦР

A) в эмульсии (для пиросеквенирования, SOLiD);

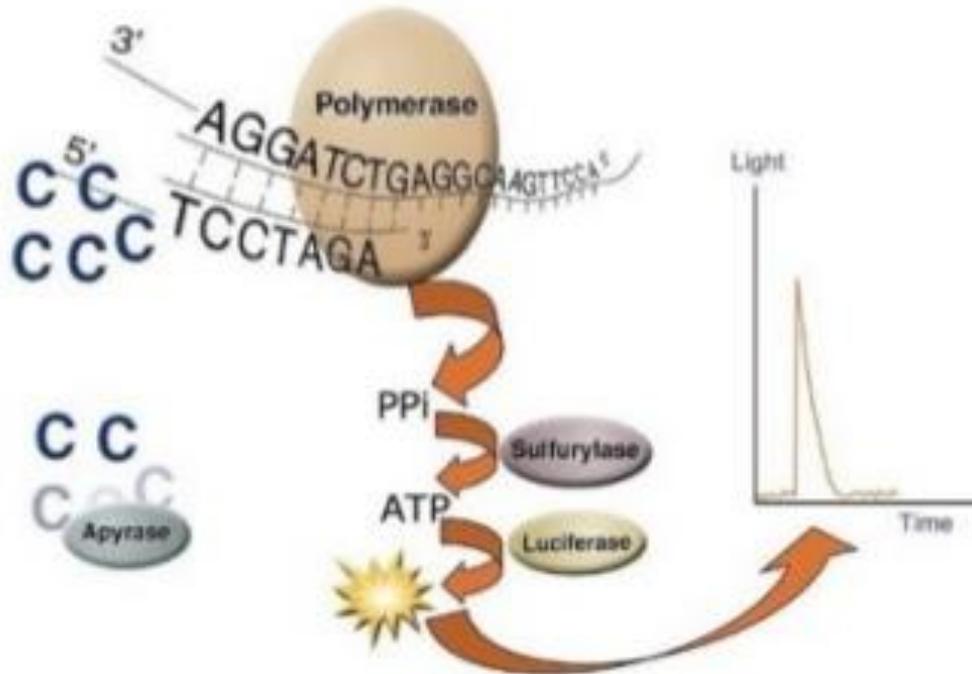
B) на стекле (bridge PCR, для Illumina)

[http://oftalmic.ru/technology\\_ngs.php](http://oftalmic.ru/technology_ngs.php)

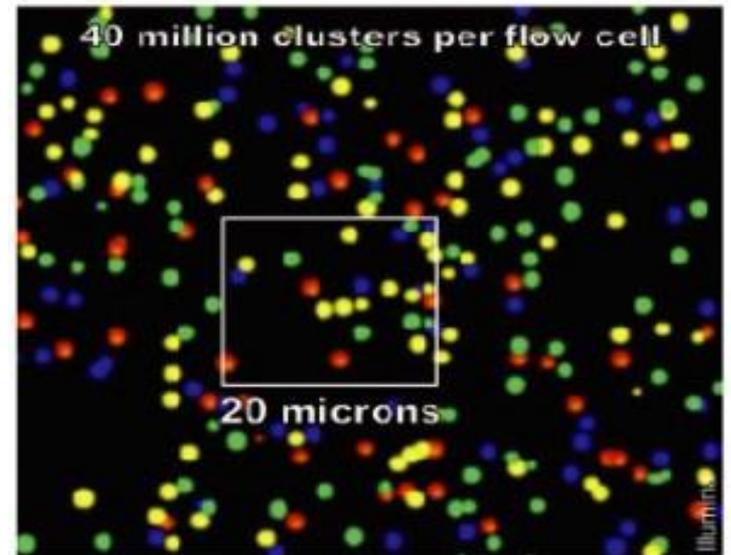
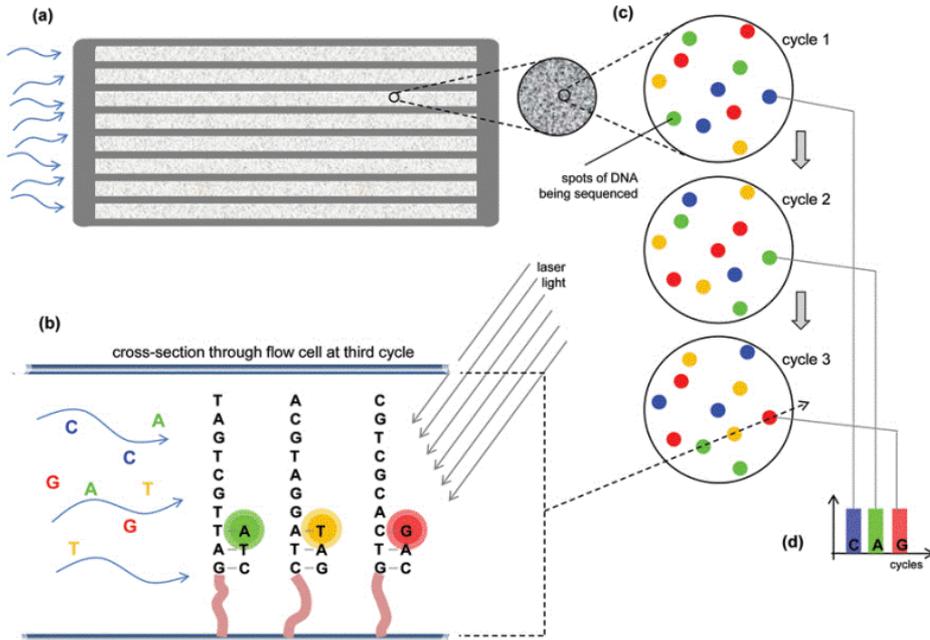
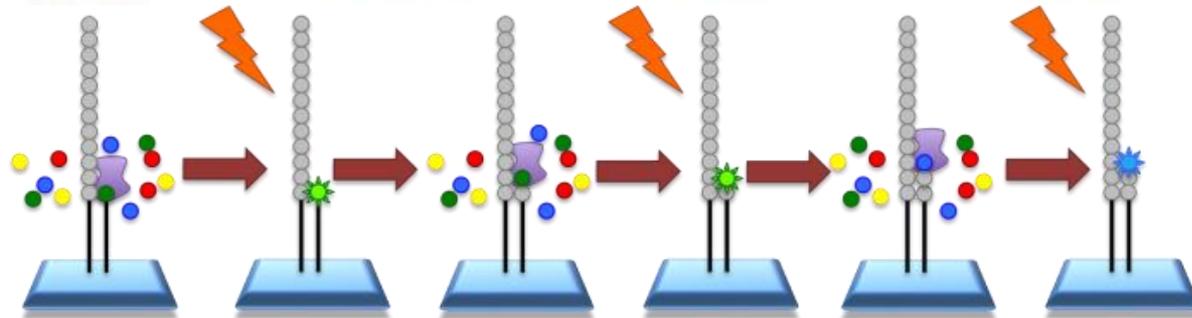
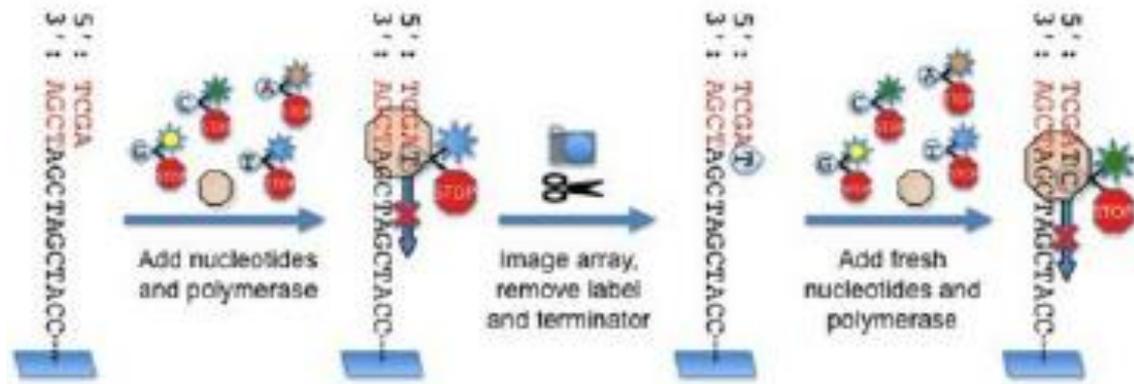
# Пиросеквенирование



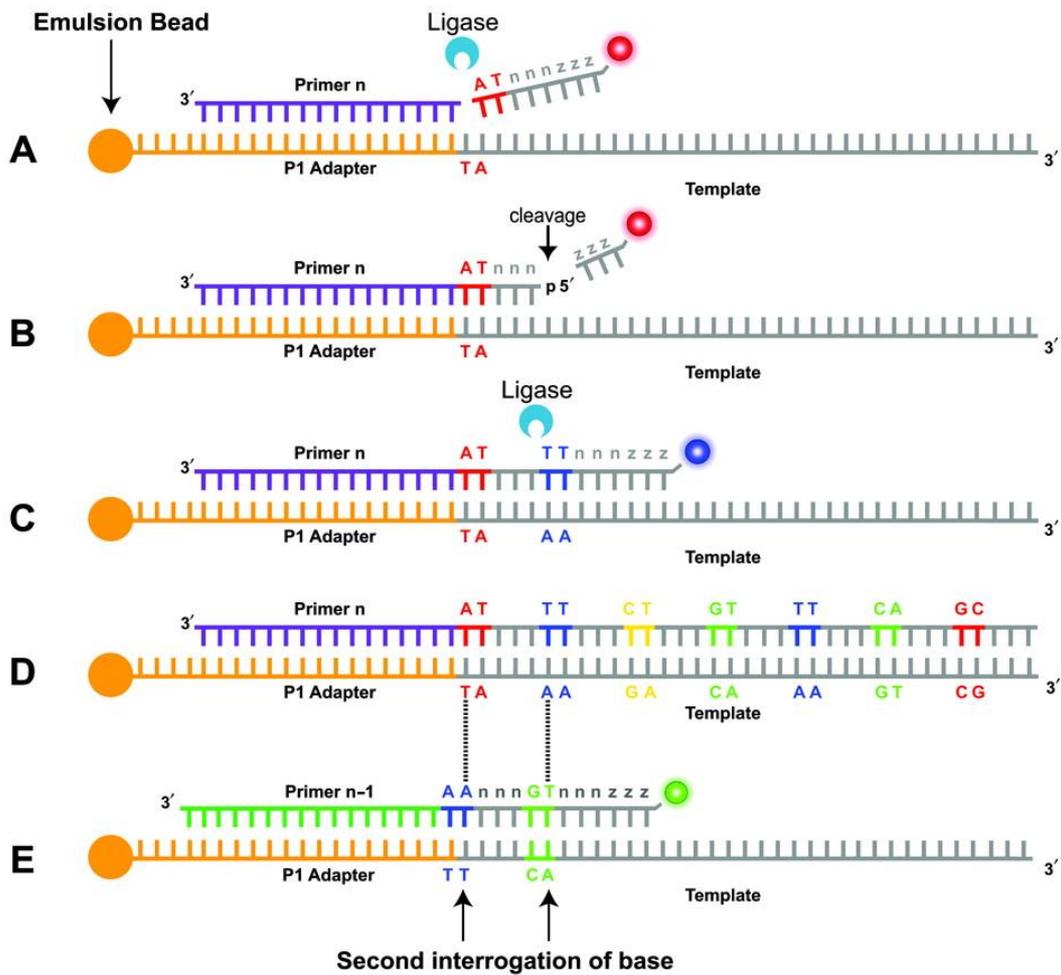
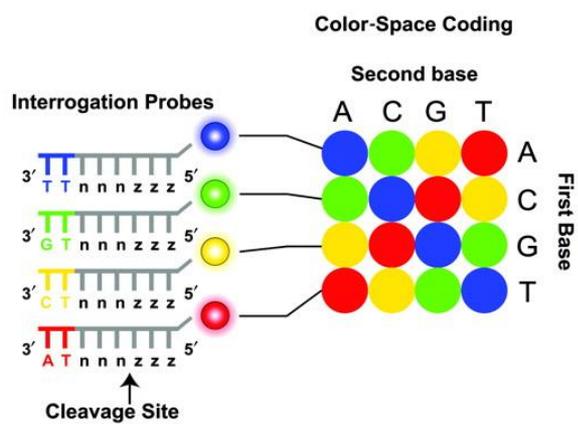
(b)



# Illumina

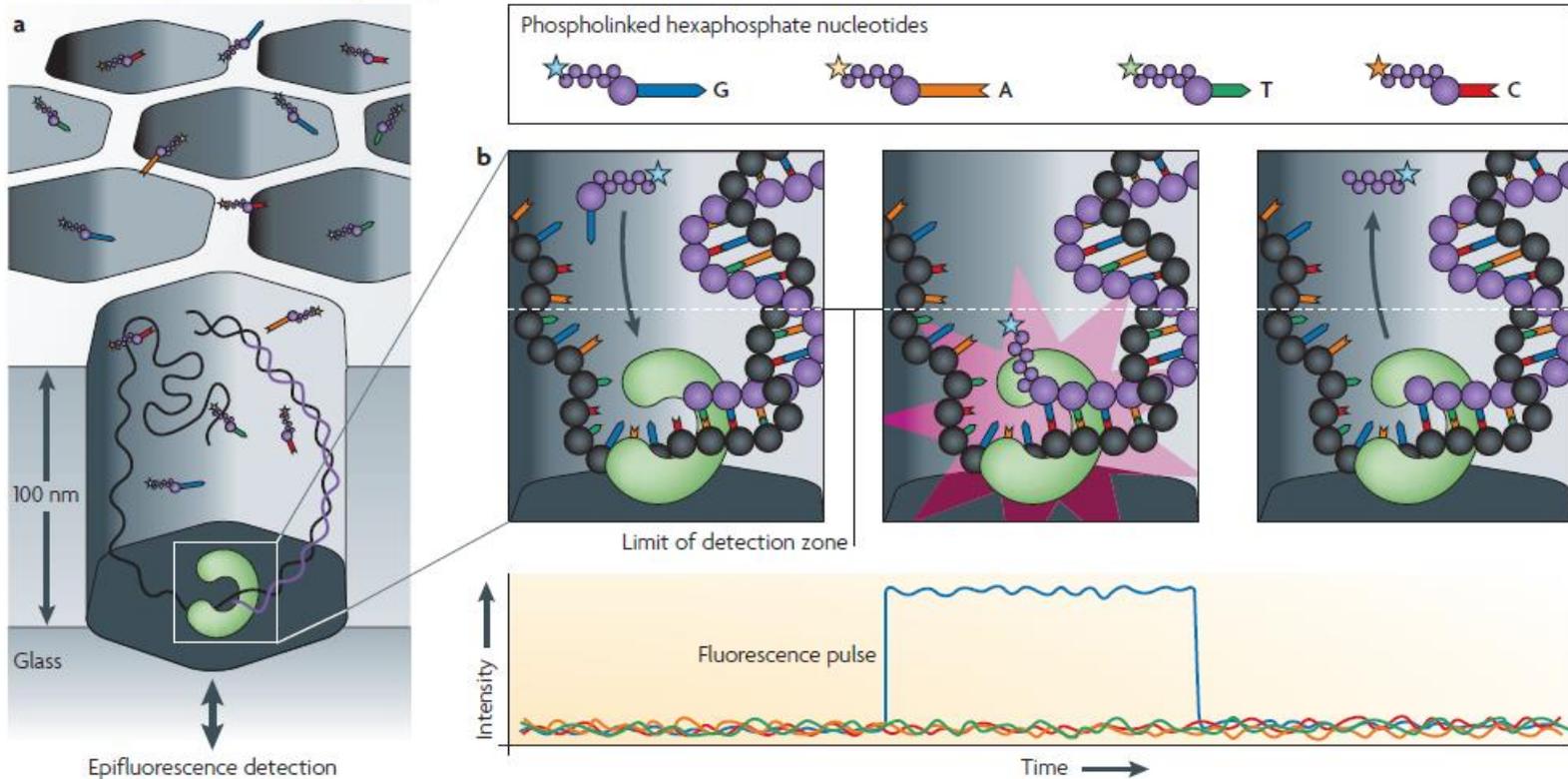


# SOLiD



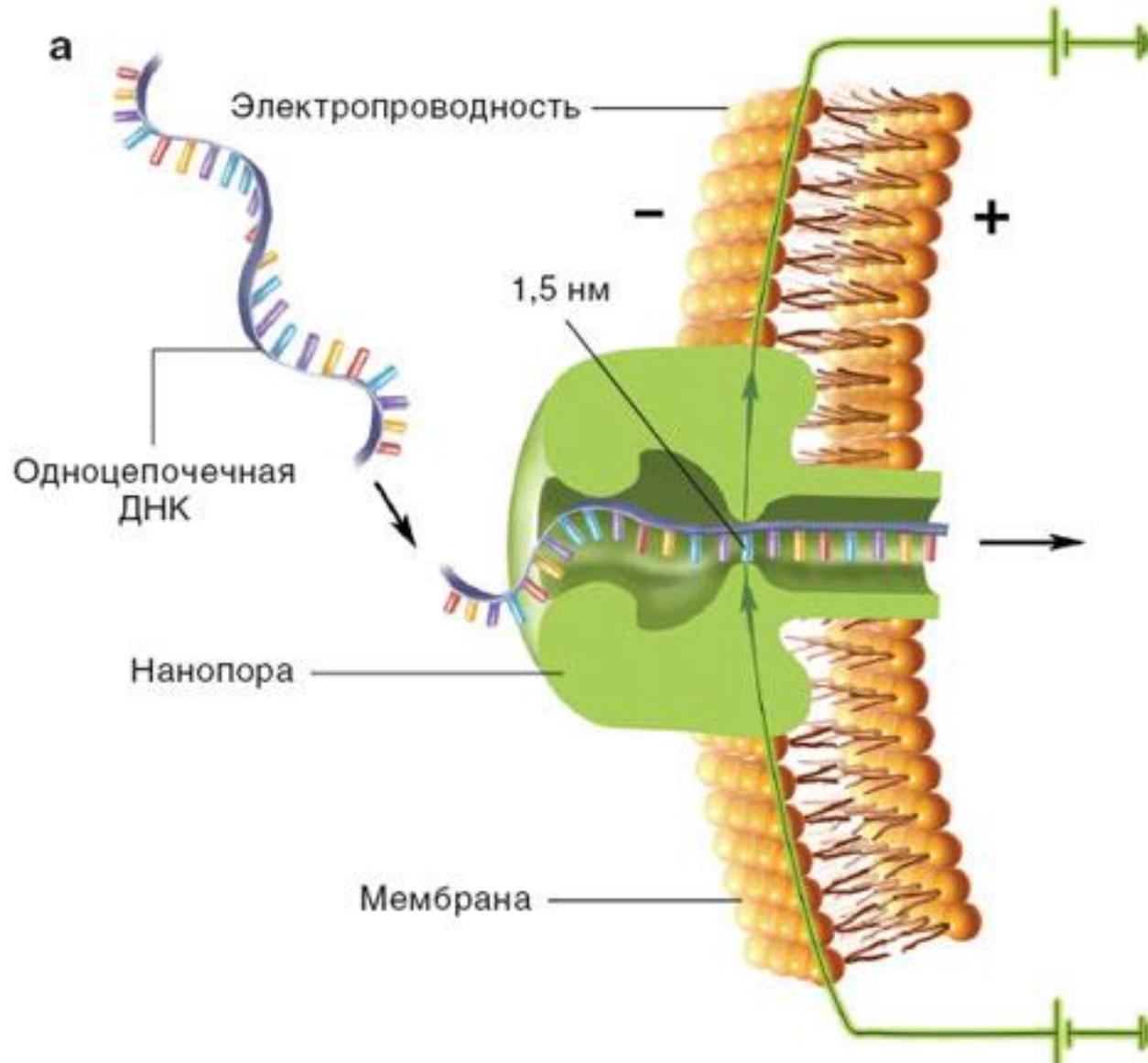
# Одномолекулярное секвенирование в реальном времени

Pacific Biosciences — Real-time sequencing

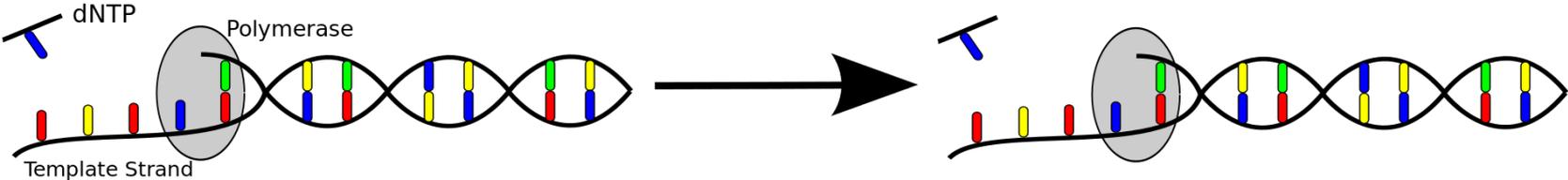


# Секвенирование третьего поколения

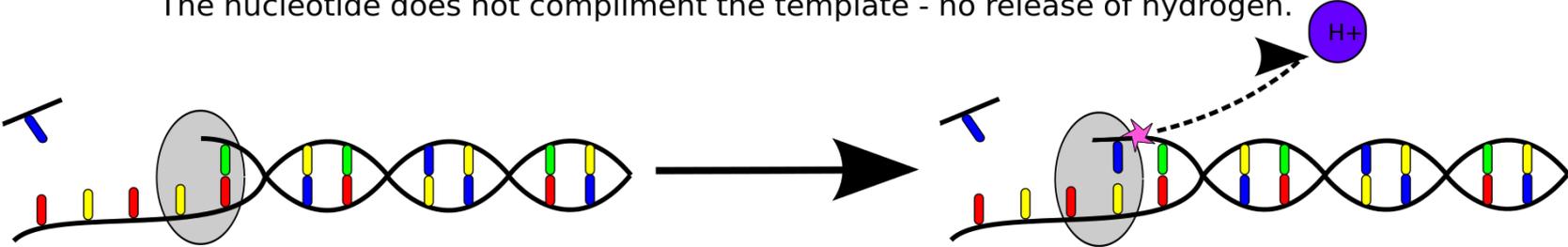
## Нанопоровое секвенирование



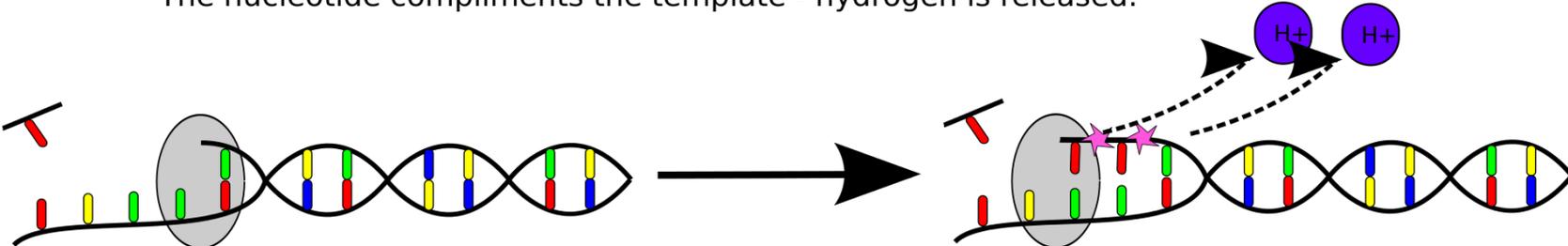
# Ионное полупроводниковое секвенирование



The nucleotide does not compliment the template - no release of hydrogen.



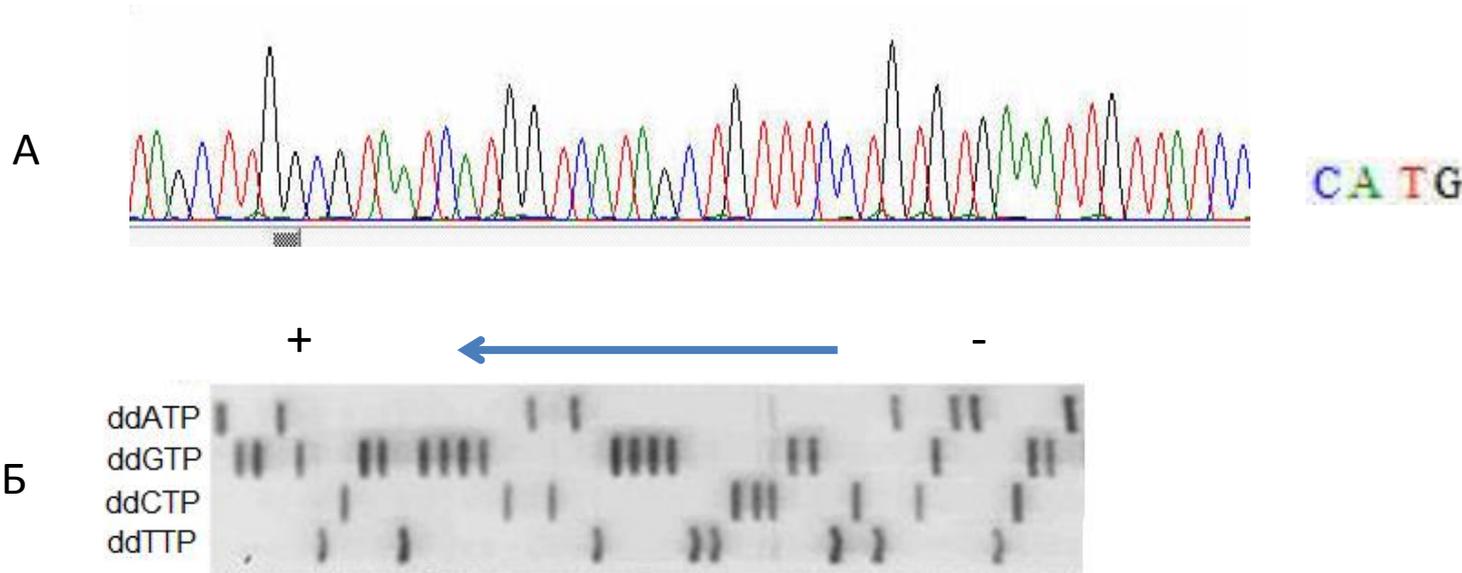
The nucleotide compliments the template - hydrogen is released.



The nucleotide compliments several bases in a row - multiple hydrogen ions are released.

Метод	Длина прочтения	Точность (на 1 прочтение)	Время на 1 запуск	Цена per 1 млн пар оснований	Преимущества	Недостатки
Single-molecule real-time sequencing (Pacific Biosciences)	30,000 bp; >100,000	87%	30 мин-20 часов	\$0.05–\$0.08	Быстро Детектирует 4mC, 5mC, 6mA. <sup>1</sup>	Дорогое оборудование
Ion semiconductor (Ion Torrent sequencing)	до 600 bp	99.6%	2 ч	\$1	Быстро Дешево	Ошибки в случае гомополимеров
Pyrosequencing (454)	700 bp	99.9%	24 ч	\$10	Быстро Блинные прочтения	Дорогое оборудование Ошибки в случае гомополимеров
Sequencing by synthesis (Illumina)	MiniSeq, NextSeq: 75-300 bp; MiSeq: 50-600 bp; HiSeq 2500: 50-500 bp; HiSeq 3/4000: 50-300 bp; HiSeq X: 300 bp	99.9% (Phred30)	1-11 дней	\$0.05 - \$0.15	Высокий выход секвенирования	Дорогое оборудование Требует высокой концентрации ДНК
Sequencing by ligation (SOLiD sequencing)	50+35 или 50+50 bp	99.9%	7-14 дней	\$0.13	Дешево.	Медленно. Ошибки на полиндромах
Nanopore Sequencing	До 500 kb	~92–97% 1 прочтение	1 мин-48 часов	\$500–999 за 1 ячейку	Длинные прочтения Портативный	Низкая производительность Точность
Chain termination (Sanger sequencing)	400 to 900 bp	99.9%	20 мин – 3 часа	\$2400	Широко используется	Дорого Трудоемко

# Задание к практической работе №3



Используя данные секвенирования, напишите определяемую последовательность ДНК.

При решении задачи обратите внимание на направление движения фрагментов ДНК при электрофорезе.

А) 5'-

Б) 5'-