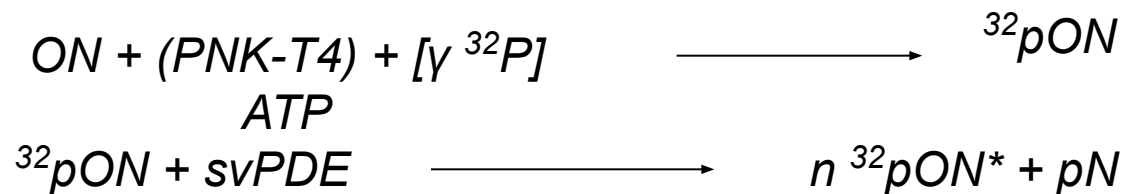


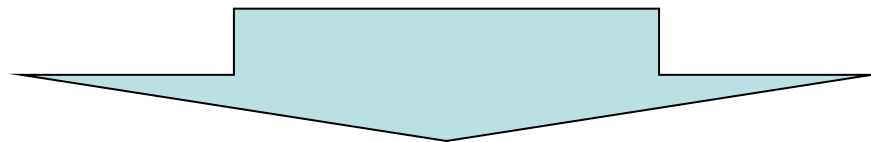
Секвенирование нуклеиновых кислот

Метод блуждающего пятна или «Сенгерпринт»

1. Пометить олигонуклеотид по 5'- или 3'- концу.
2. Частичный гидролиз олигонуклеотида соответствующими экзонуклеазами.
3. Электрофорез на ацетате целлюлозы при pH 3,5
4. Гомохроматографию на DEAE-целлюлозе.
5. Радиоавтография полученной хроматограммы
6. Расшифровка результатов

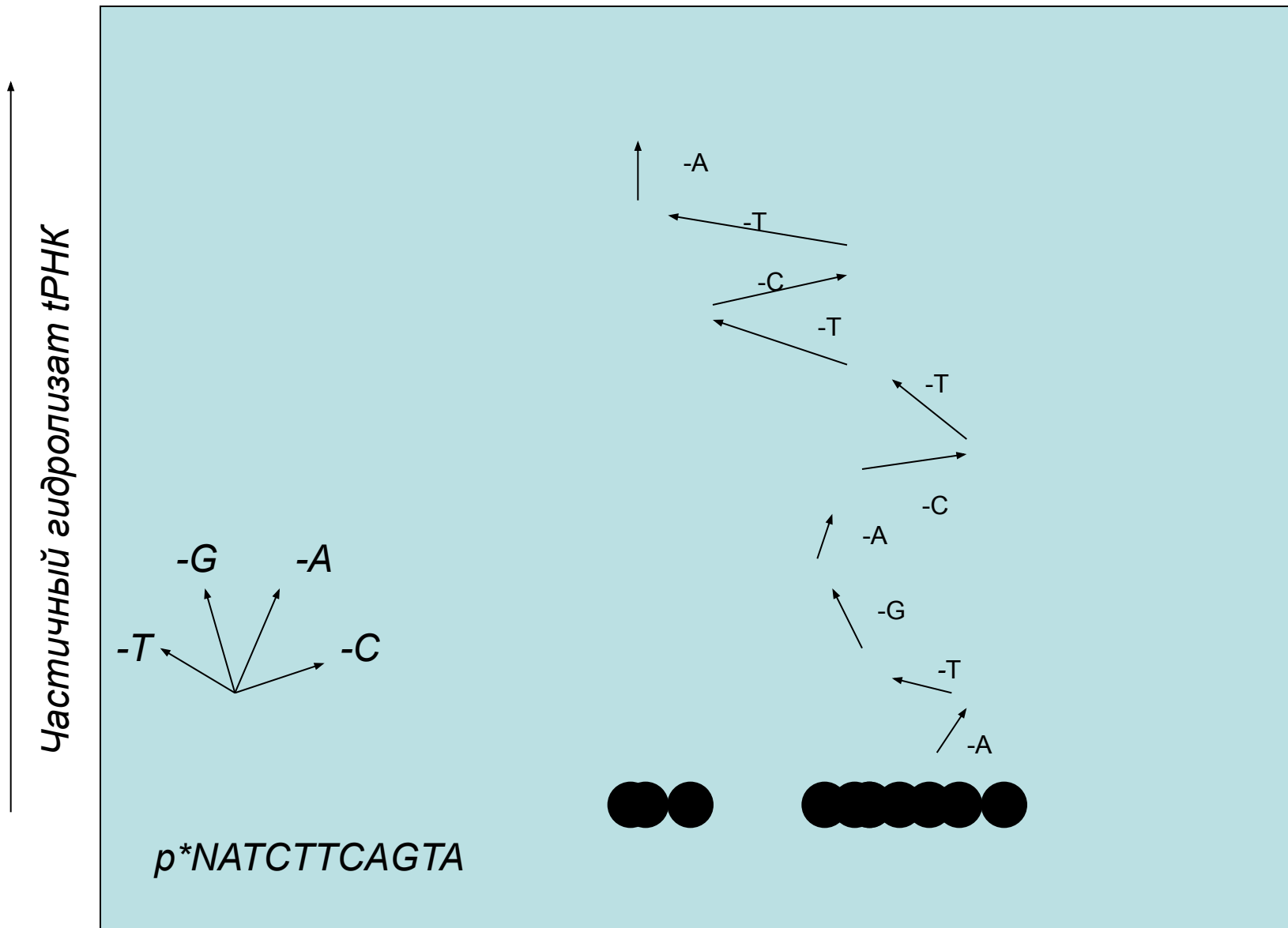


*Электрофорез на ацетате целлюлозы
в аммоний ацетатном буфере при pH 3,5*



DEAE-целлюлоза

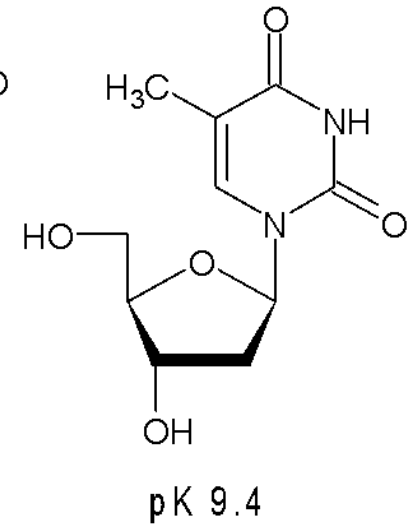
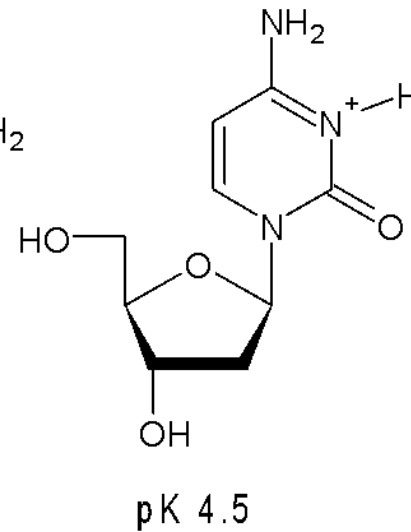
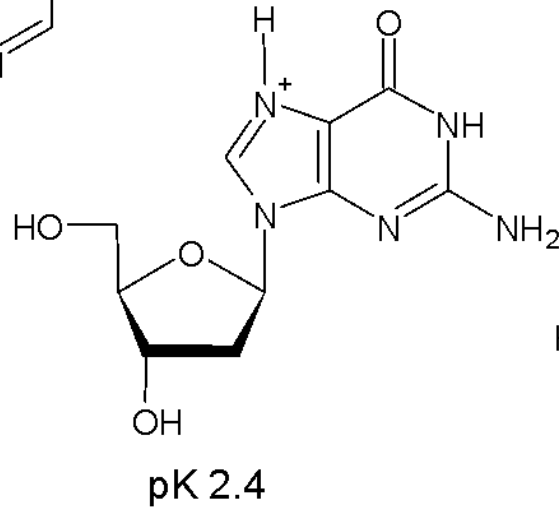
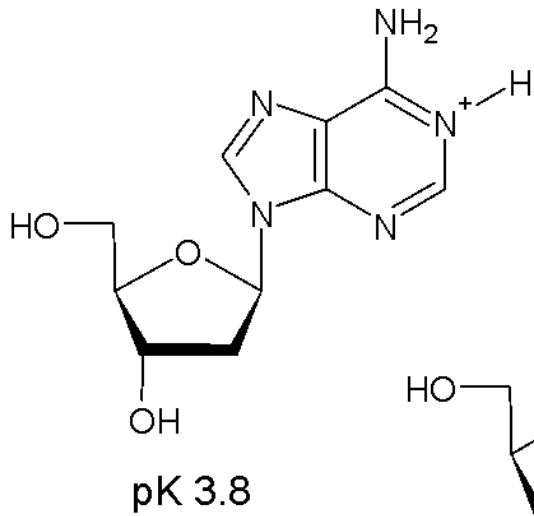
Гомохроматография на DEAE-целлюлозе



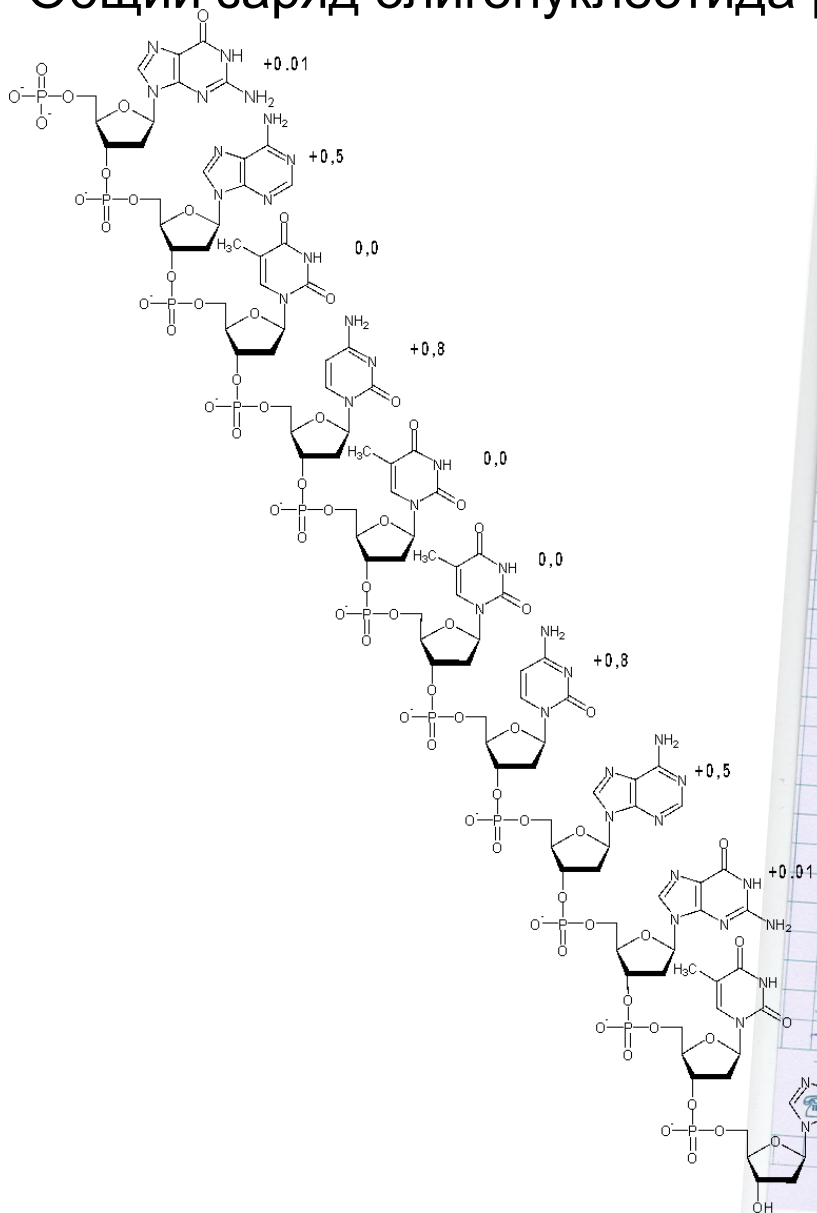
рК оснований

Нуклеотиды	рK _a оснований-N	рK ₁ фосфата	рK ₂ фосфата
5'-AMP	3.8 (N-1)	0.9	6.1
5'-GMP	9.4 (N-1) 2.4 (N-7)	0.7	6.1
5'-CMP	4.5 (N-3)	0.8	6.3
5'-UMP	9.5 (N-3)	1.0	6.4

Протонирование оснований при pH 3,5

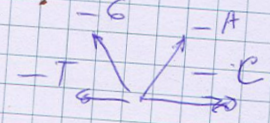


Общий заряд олигонуклеотида pGATCTTCAGTA и его фрагментов



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

	0,5	0,75	0,5, 0,5	0,5
11	3399			
10	3087	-A	12 - 3 = 9	377,67
9	2784	-T	11 - 2,5 = 8,5	14,49 363,18
8	2456	-G	10 - 2,5 = 7,5	-8,02 371,20
7	2143	-A	9 - 2,5 = 6,5	-6,60 377,85
6	1855	-C	8 - 2 = 6	20,68 357,17
5	1552	-T	7 - 1,25 = 5,75	34,56 322,61
4	1249	-T	6 - 1,25 = 4,75	-4,13 226,74
3	961	-C	5 - 1,25 = 3,75	-6,33 333,07
2	657	-T	4 - 0,5 = 3,5	58,50 279,57
1	345	-A	3 - 0,5 = 2,5	11,77 262,80
			2 - 0 = 2	90,30 172,50
		-A		+14,49
		-T		-8,02
		-G		-6,60
		-A		+20,68
		-C		34,56
		-T		-4,13
		-T		-6,33
		-G		58,50
		-T		11,77
		-A		90,30



123060 г. Москва, а/я 80
(095)196-52-90, 196-18-57

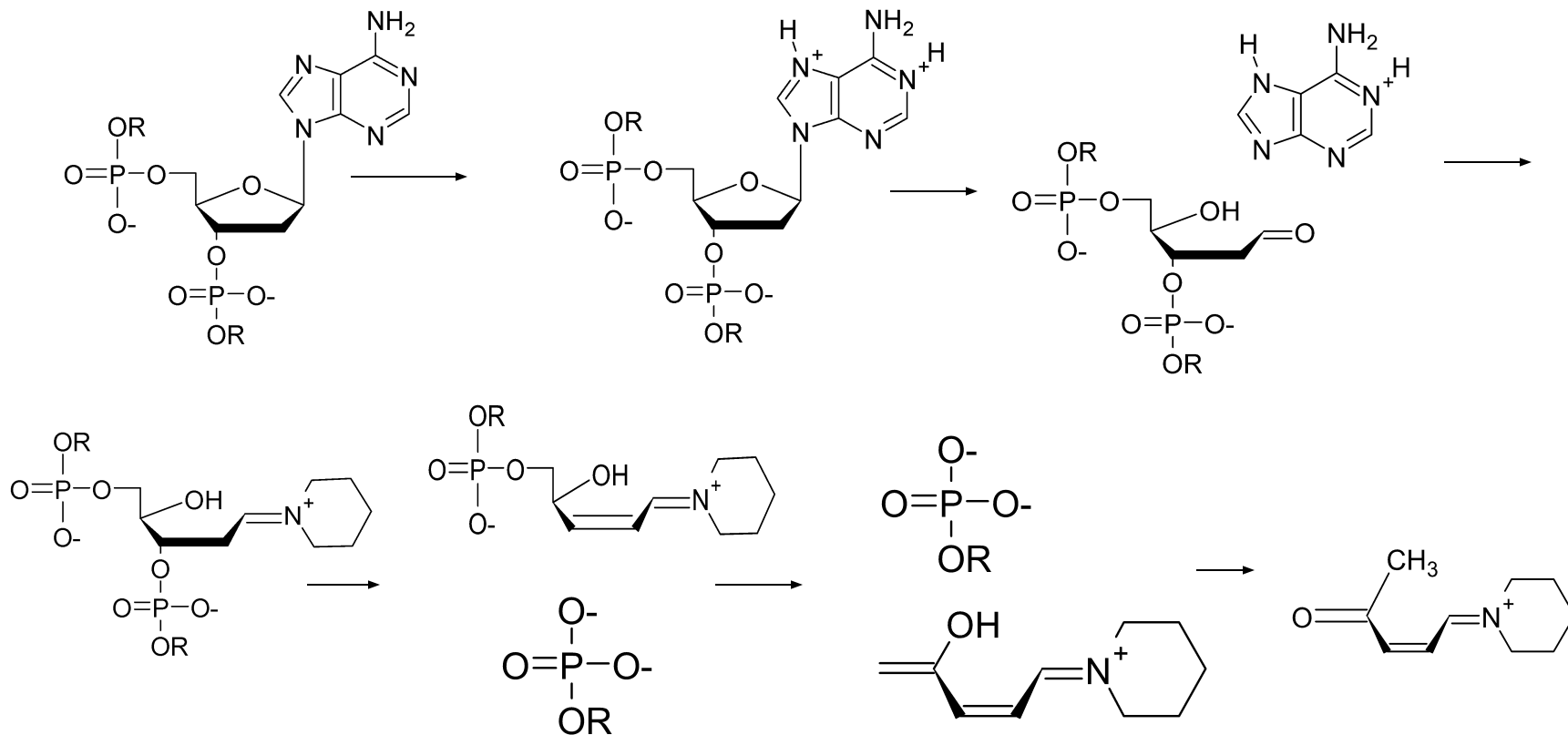
support@ampersand.ru
http://www.ampersand.ru



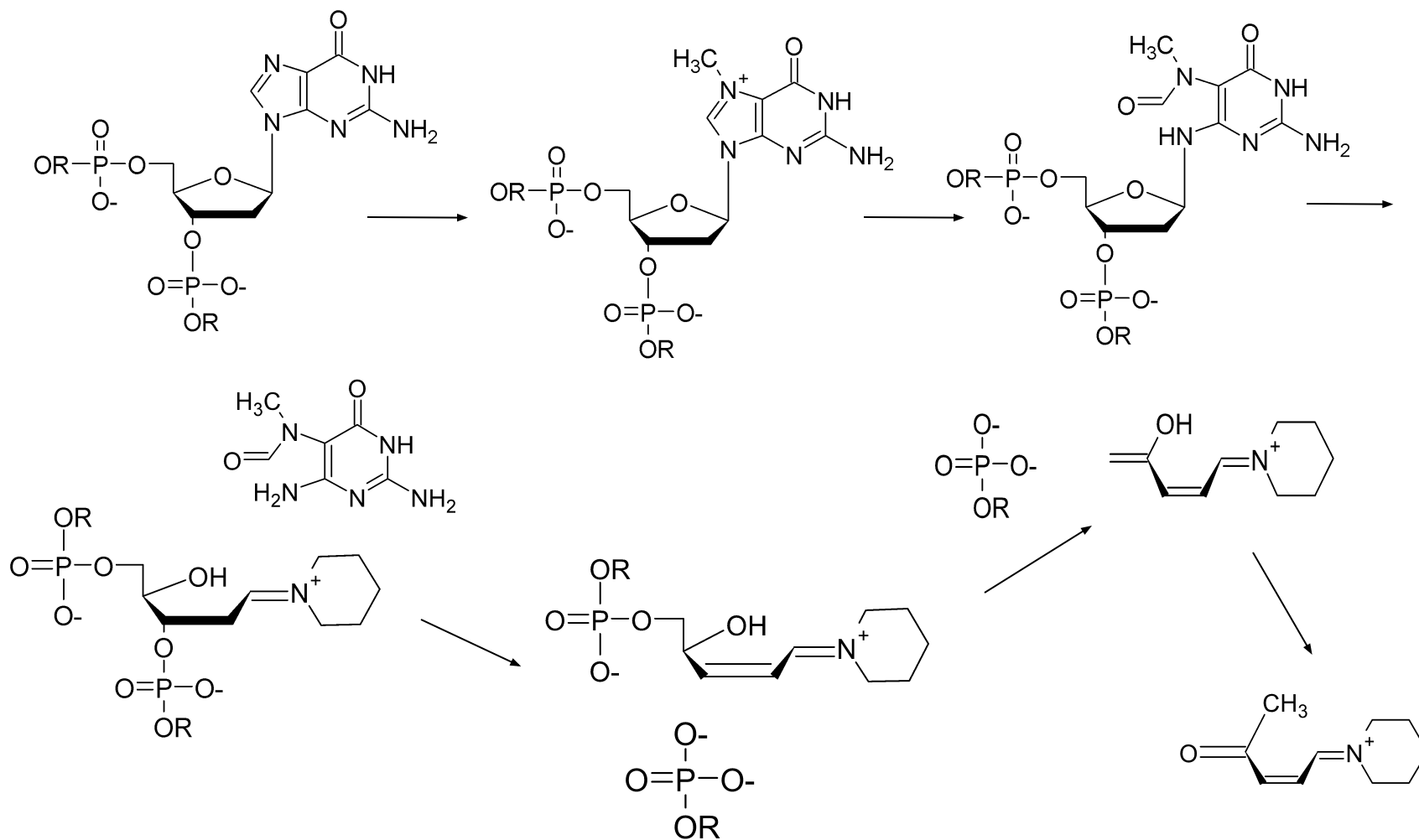
Определение последовательности нуклеиновых кислот методом Максама - Гилберта

1. Пометить фрагмент ДНК (РНК) с 5'- или 3'- конца
2. Провести 4 химические реакции для отщепления оснований от цепи НК
3. Расщепить сахарофосфатный остов в местах где отсутствуют основания
4. Гель-электрофорез в ПААГ
5. Радиоавтография
6. Расшифровка результатов

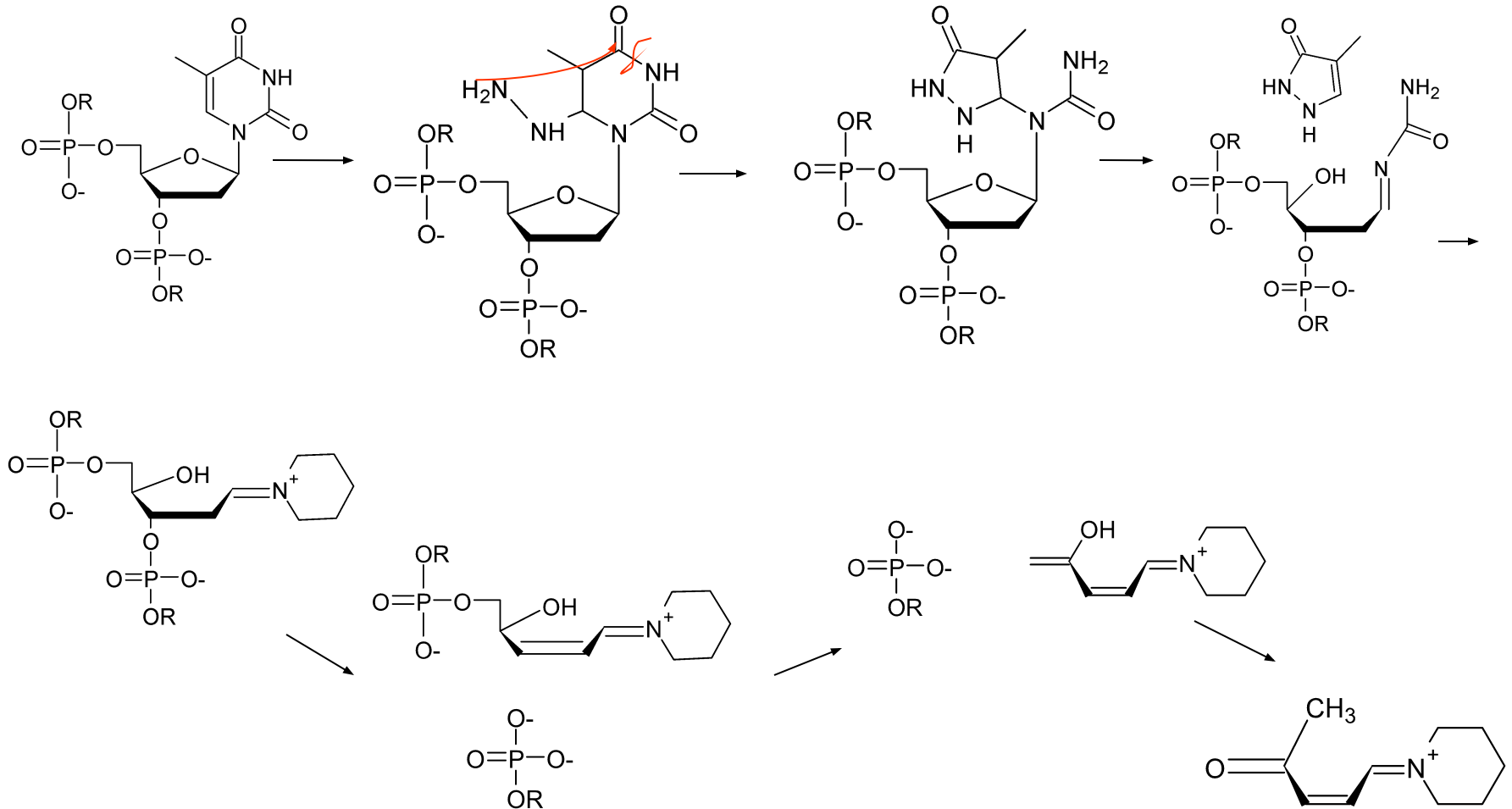
Отщепление пуриновых оснований под действием 60% HCOOH



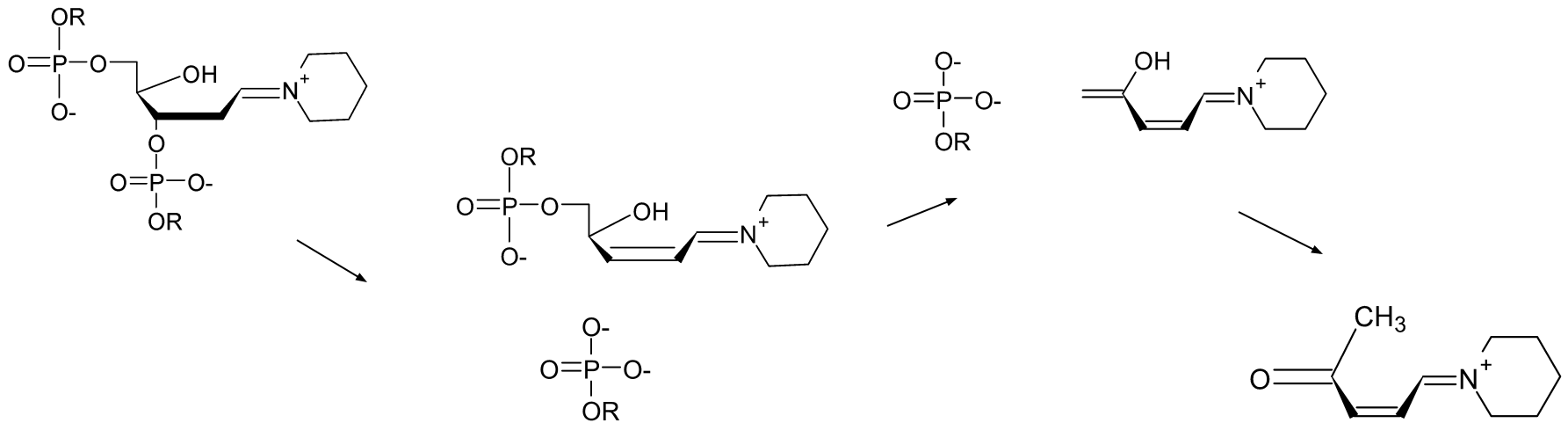
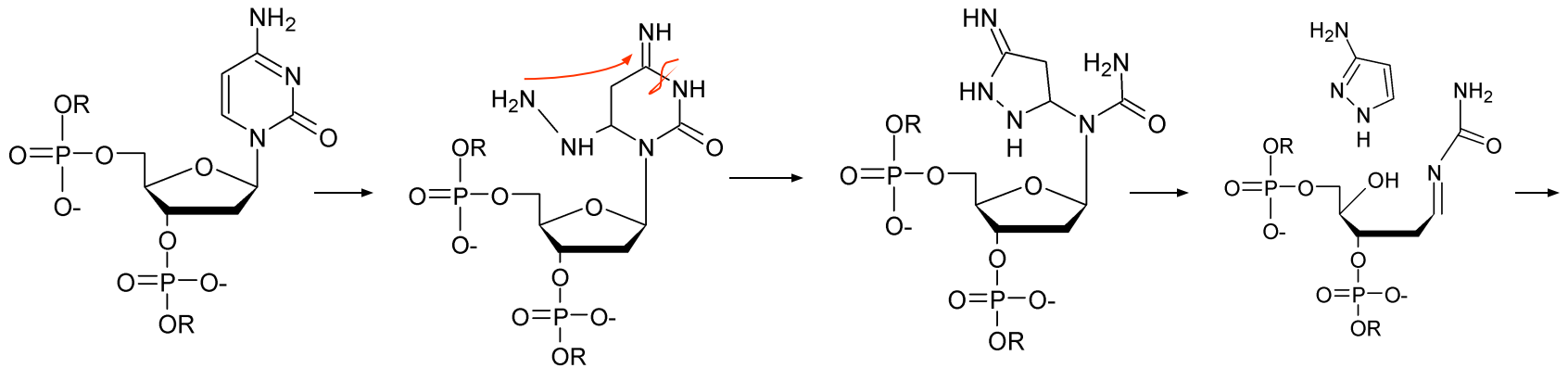
Отщепление гуанина под действием Me_2SO_4



Отщепление тимина под действием гидразина



Отщепление цитозина под действием гидразина в присутствии 2М NaCl



Общая схема проведения секвенирования по Максаму - Гилберту

5' – GATCGCTATACGAG**GAATTC**AGCTCGA - 3'
3' – CTAGCGATATGCT**CTTAAG**TCGAGCT - 5'

Т4-полинуклеотидкиназа, γ -АТФ

5'-*pGATCGCTATACGAG**GAATTC**AGCTCGA - 3'
3' - CTAGCGATATGCT**CTTAAG**TCGAGCTp*-5'

Рестриктаза EcoR I

5'-*pGATCGCTATACGAG**GAATTC**AGCTCGA - 33'
3' - CTAGCGATATGCT**CTTAAG**TCGAGCTp*-55'

Разделение фрагментов

5'-*pGATCGCTATACGAG**G** - 3'
3' - CTAGCGATATGCT**CTTAA** -5'

5'- **AATTC**AGCTCGA - 3'
3' - **GTCGAGCT**p*-5'

5'-*pGATCGCTATACGAG - 3'
3' - CTAGCGATATGCTCTTAA -5'

Химическая модификация
по Максому-Гилберту

Me_2SO_4

H^+

$\text{NH}_2\text{-NH}_2$

$\text{NH}_2\text{-NH}_2 + \text{NaCl}$

5'-*pGATCGCTATACGAG - 3'
3' - CTAGCGATATGCTCTTAA -5'

5'-*pGATCGCTATACGAG - 3'
3' - CTAGCGATATGCTCTTAA -5'

5'-*pGATCGCTATACGAG - 3'
3' - CTAGCGATATGCTCTTAA -5'

5'-*pGATCGCTATACGAG - 3'
3' - CTAGCGATATGCTCTTAA -5'

5'-*pGATCGCTATACGAG - 3'
3' - CTAGCGATATGCTCTTAA -5'

5'-*pGATCGCTATACGAG - 3'
3' - CTAGCGATATGCTCTTAA -5'

5'-*pGATCGCTATACGAG - 3'
3' - CTAGCGATATGCTCTTAA -5'

5'-*pGATCGCTATACGAG - 3'
3' - CTAGCGATATGCTCTTAA -5'

5'-*pGATCGCTATACGAG - 3'
3' - CTAGCGATATGCTCTTAA -5'

5'-*pGATCGCTATACGAG - 3'
3' - CTAGCGATATGCTCTTAA -5'

5'-*pGATCGCTATACGAG - 3'
3' - CTAGCGATATGCTCTTAA -5'

5'-*pGATCGCTATACGAG - 3'
3' - CTAGCGATATGCTCTTAA -5'

5'-*pGATCGCTATACGAG - 3'
3' - CTAGCGATATGCTCTTAA -5'

5'-*pGATCGCTATACGAG - 3'
3' - CTAGCGATATGCTCTTAA -5'

5'-*pGATCGCTATACGAG - 3'

G

A+G

T+C

C

*pGATCGCTATACGA
*pGATCGCTATAC
*pGATC
*p

*pGATCGCTATACGA
*pGATCGCTATACG
*pGATCGCTATAC
*pGATCGCTAT
*pGATCGCT
*pGATC
*pG
*p

*pGATCGCTATA
*pGATCGCTA
*pGATCGC
*pGATCG
*pGAT
*pGA

*pGATCGCTATA
*pGATCG
*pGAT

G

G+A

T+C

C

3'-

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

5'-

—

+