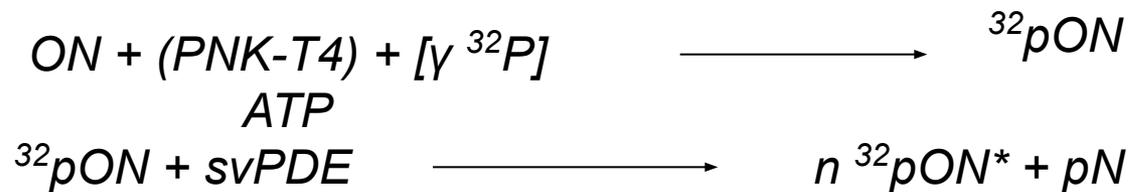


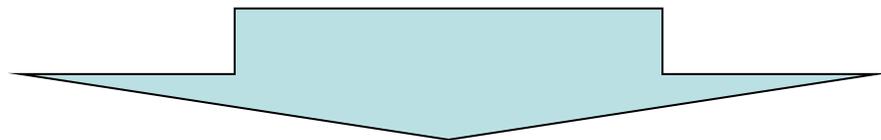
# Секвенирование нуклеиновых кислот

# 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

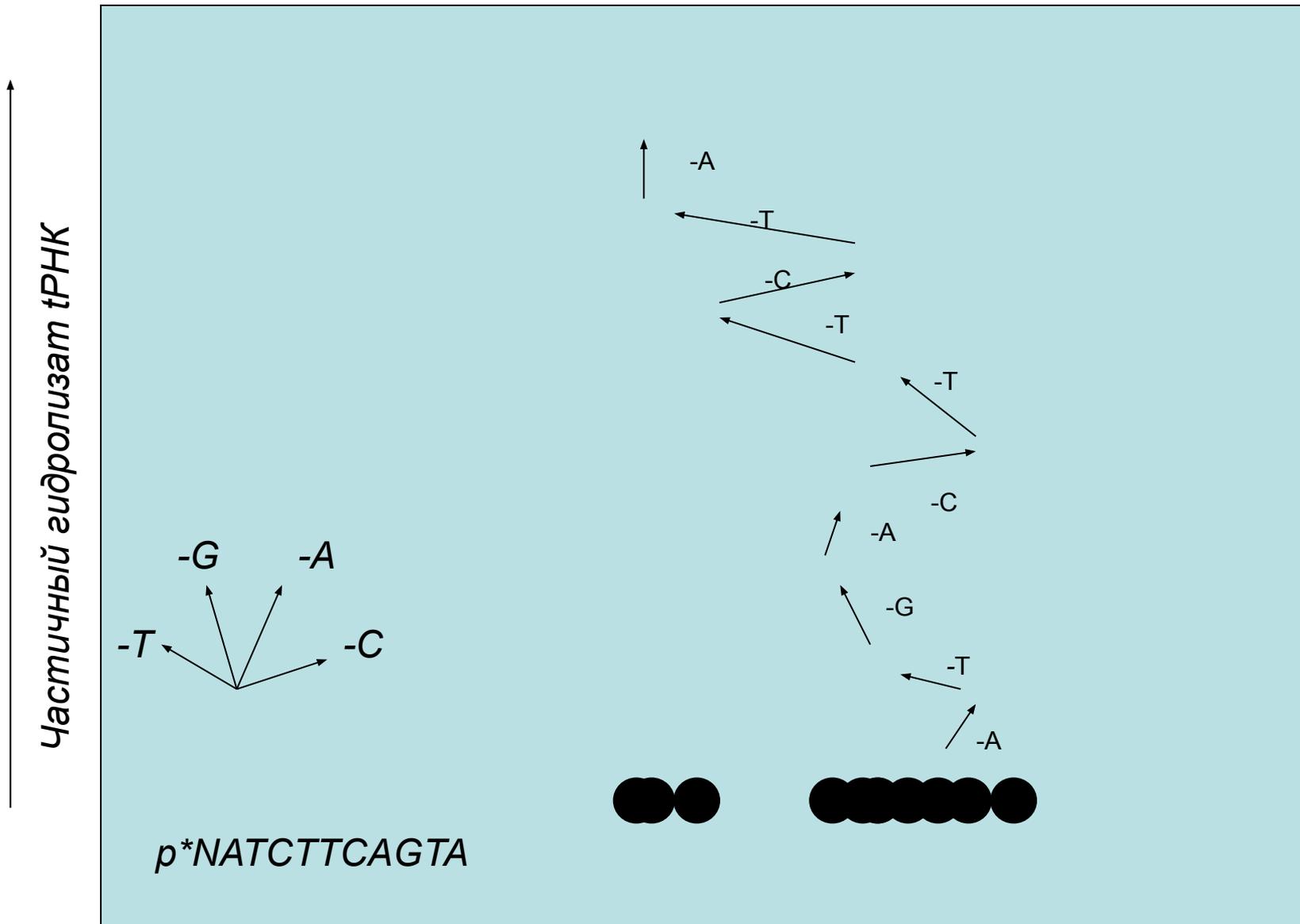


*Электрофорез на ацетате целлюлозы  
в аммоний ацетатном буфере при pH 3,5*



*DEAE-целлюлоза*

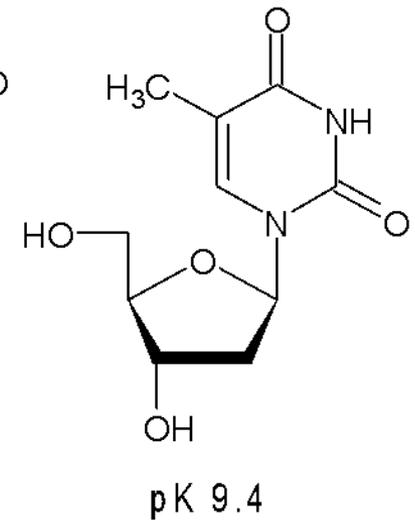
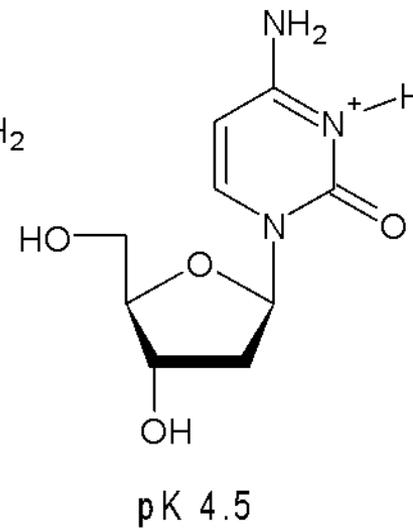
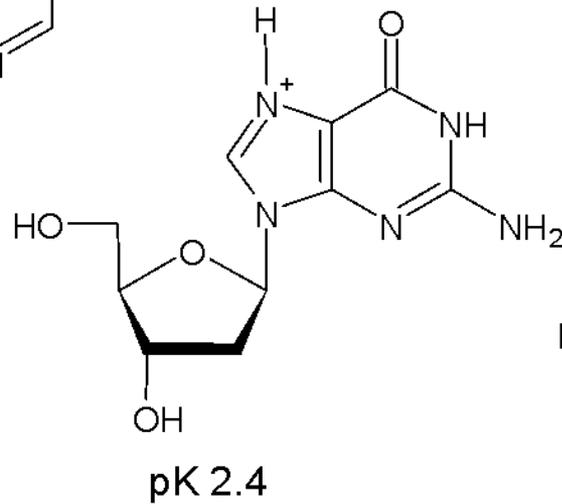
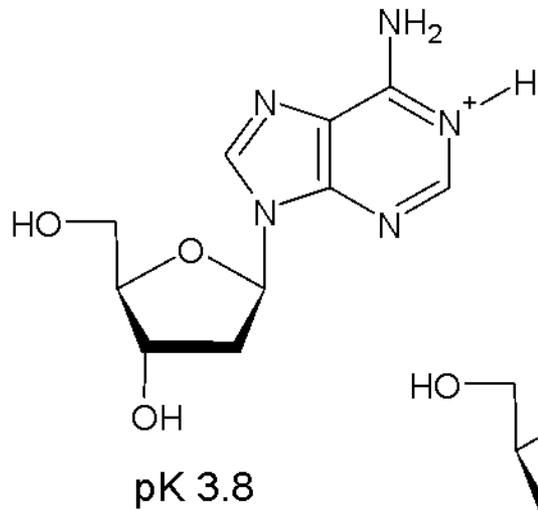
# Гомохроматография на DEAE-целлюлозе



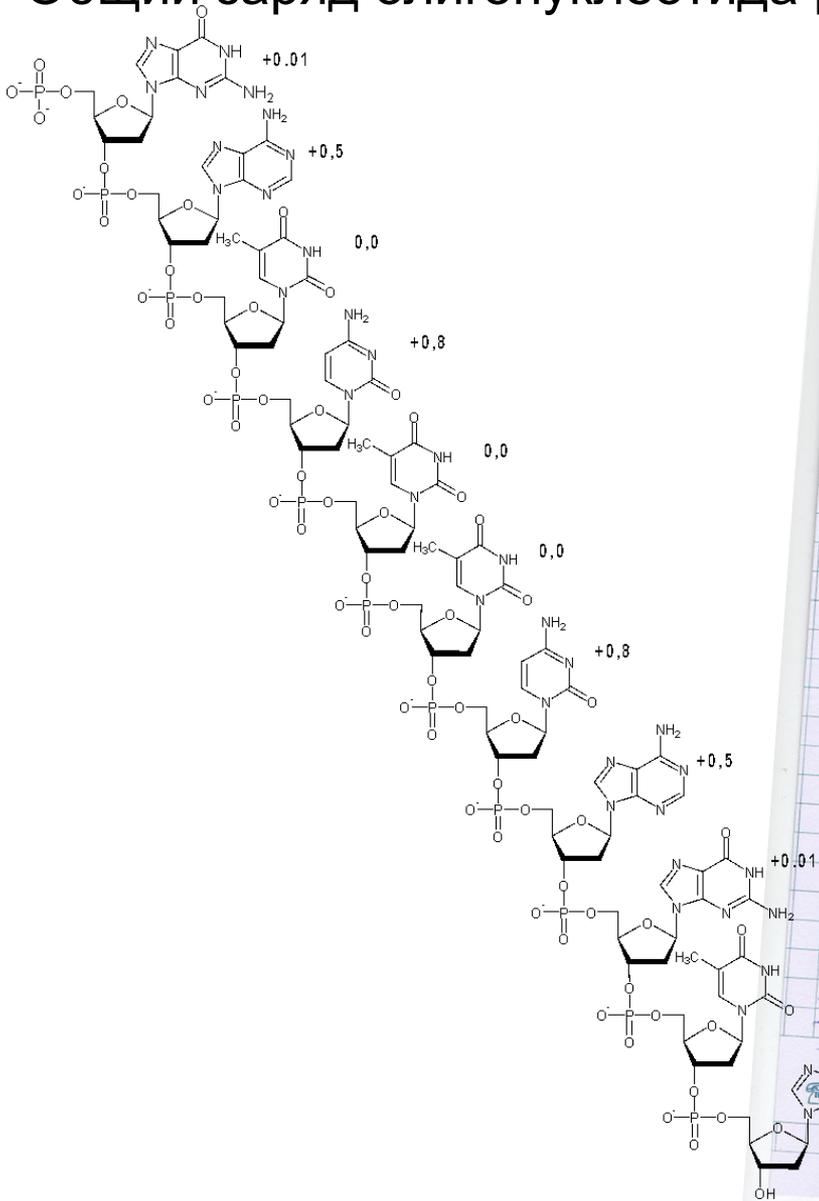
# рК оснований

| Нуклеотиды | рK <sub>a</sub> оснований-N | рK <sub>1</sub> фосфата | рK <sub>2</sub> фосфата |
|------------|-----------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 5'-AMP     | 3.8 (N-1)                   | 0.9                     | 6.1                     |
| 5'-GMP     | 9.4 (N-1)<br>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



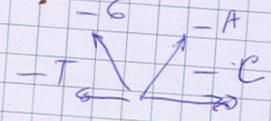
# Общий заряд олигонуклеотида pGATCTTCAGTA и его фрагментов



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

|    |      |    |                 |        |
|----|------|----|-----------------|--------|
| 11 | 3399 |    | 12 - 3 = 9      | 377,67 |
| 10 | 3087 | -A | 11 - 2,5 = 8,5  | 14,49  |
| 9  | 2784 | -T | 10 - 2,5 = 7,5  | 8,02   |
| 8  | 2456 | -G | 9 - 2,5 = 6,5   | 6,60   |
| 7  | 2143 | -A | 8 - 2 = 6       | 20,68  |
| 6  | 1855 | -C | 7 - 1,25 = 5,75 | 34,56  |
| 5  | 1552 | -T | 6 - 1,25 = 4,75 | 4,13   |
| 4  | 1249 | -T | 5 - 1,25 = 3,75 | 6,33   |
| 3  | 961  | -C | 4 - 0,5 = 3,5   | 58,50  |
| 2  | 657  | -T | 3 - 0,5 = 2,5   | 11,77  |
| 1  | 345  | -A | 2 - 0 = 2       | 90,30  |

|    |        |    |       |
|----|--------|----|-------|
| -A | +14,49 | -T | 11,77 |
| -T | -8,02  | -A | 90,30 |
| -G | -6,60  |    |       |
| -A | +20,68 |    |       |
| -C | 34,56  |    |       |
| -T | -4,13  |    |       |
| -T | -6,33  |    |       |
| -G | 58,50  |    |       |



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

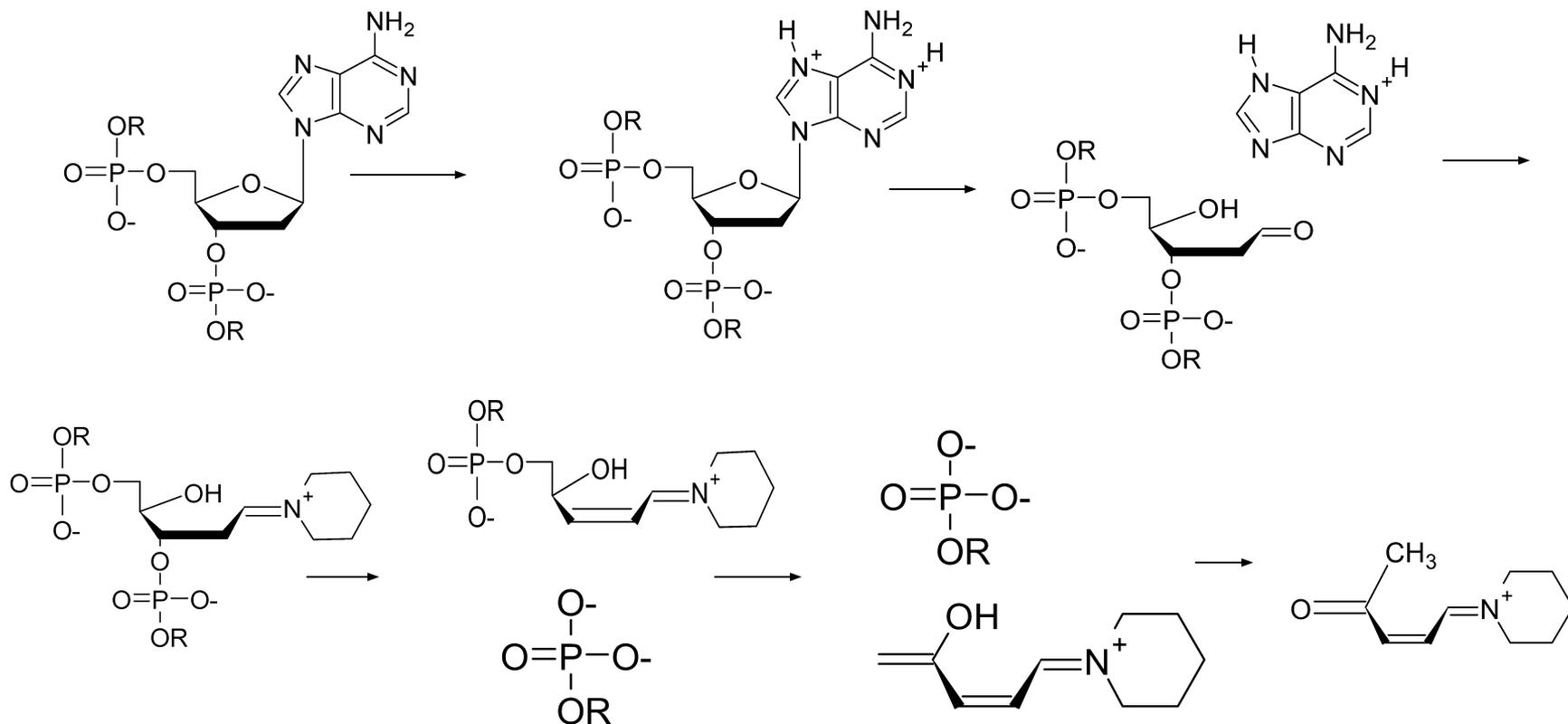
support@ampersand.ru  
http://www.ampersand.ru



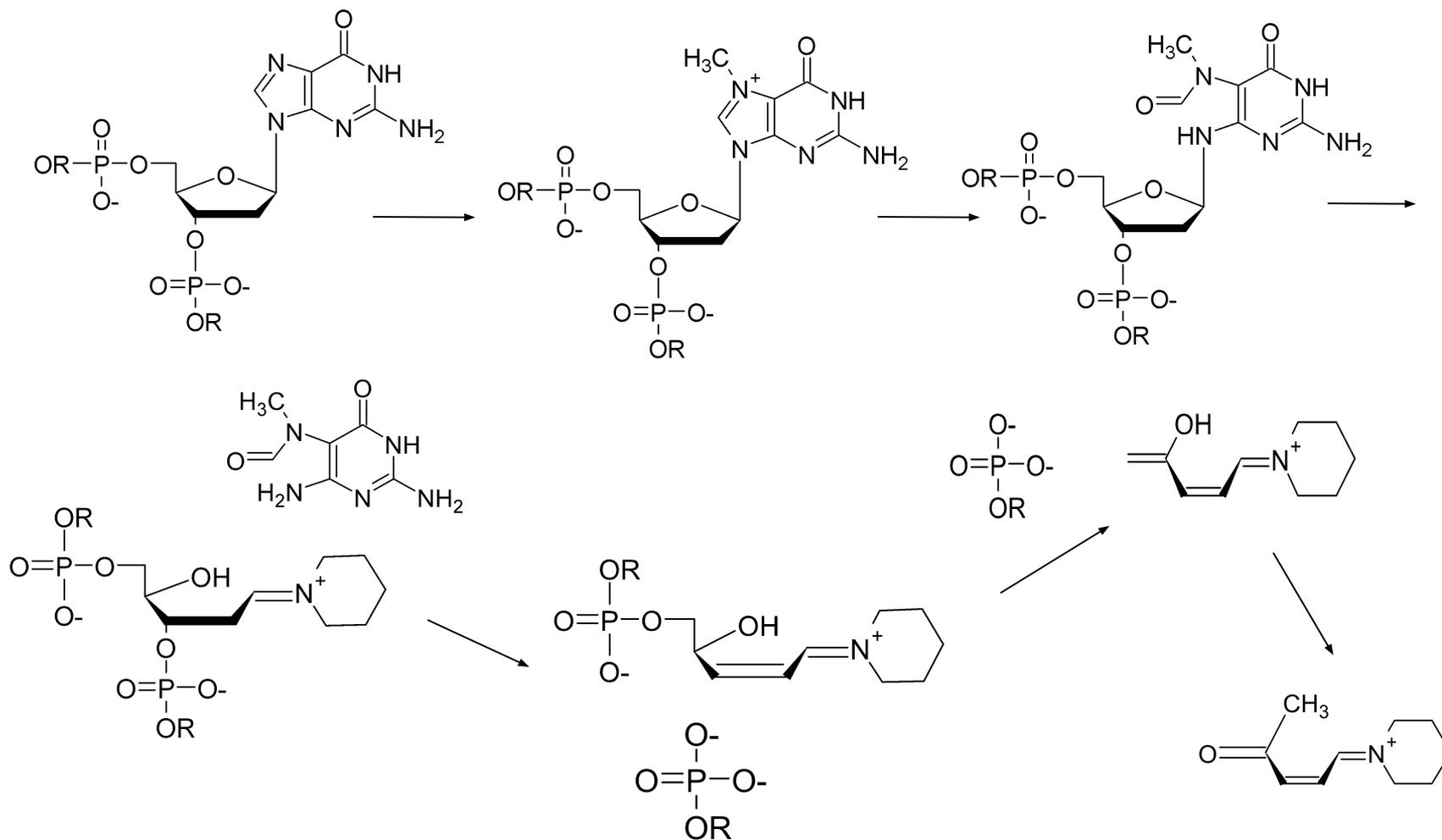
# Определение последовательности нуклеиновых кислот методом Максама - Гилберта

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

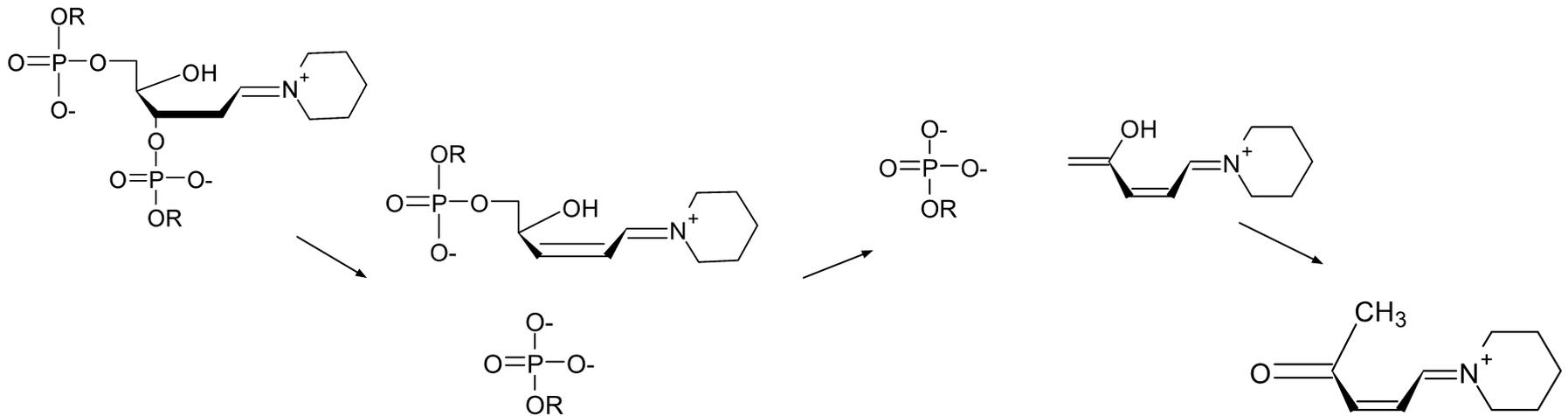
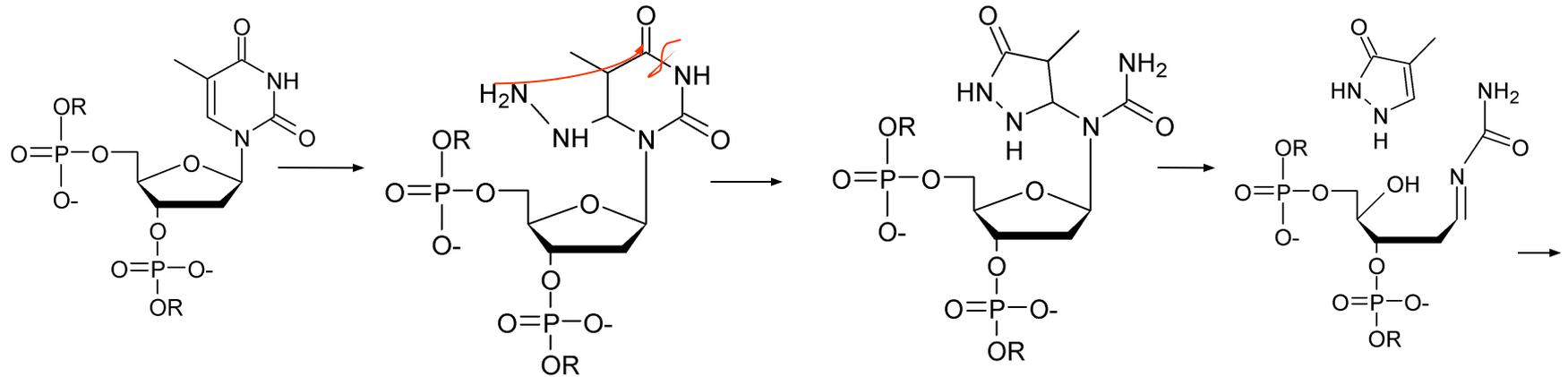
# Отщепление пуриновых оснований под действием 60% HCOOH



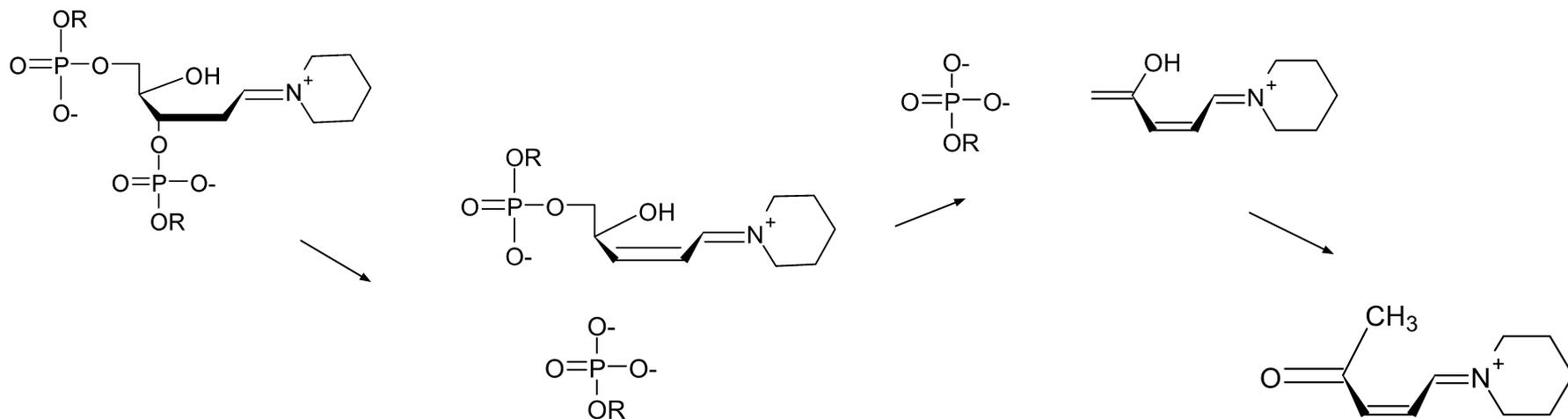
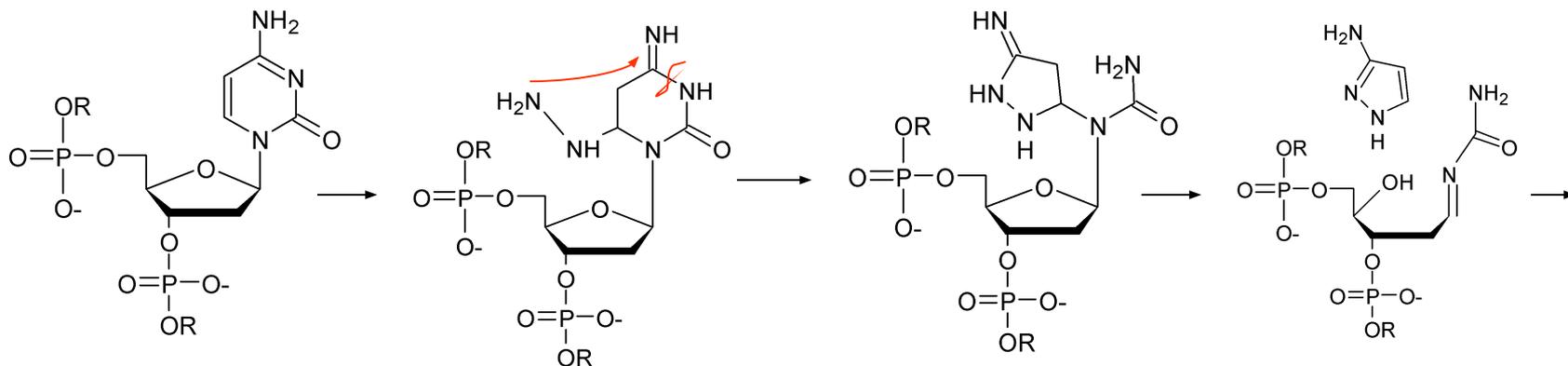
# Отщепление гуанина под действием $\text{Me}_2\text{SO}_4$



# 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,  $\gamma$ -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 – 3'  
3' – CTAGCGATATGCT**CTTAA** – 5'

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

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

Химическая модификация  
по Максему-Гилберту

$\text{Me}_2\text{SO}_4$

$\text{H}^+$

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

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

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'-

—

+