

# Қолданбалы иммунология. Молекулалық биологиялық әдістер: НҚ гибридизациялау, ПТР , ДНҚ секвенирлеу

Орындаған: Абдирасил П.

ТОП: 207А

Қабылдаған: Абдраманова А.

# Жоспар:

- ДНҚ секвенирлеу

# ДНҚ реттілігі бойынша оның анықтамасы түсініледі: нуклеотидті реттілігі

- ДНҚ реттілігі бойынша оның анықтамасы түсініледі: нуклеотидной реттілігі Адам геномын декодтау- гендерді картаға түсіру- реттеуші элементтерді анықтау- жаңа генетикалық маркерлер- адам мен сүтқоректілердің эволюциясы- популяциялық зерттеулер-- ДНҚ диагностикасына арналған праймерлер дизайны
- Күнделікті тәжірибеде ғылыми және диагностикалық зертханалардың сәйкестендіру патологиялық мутациялар- полиморфты анықтау нұсқалары- метилдеу карталарын құру- ген- супрессорлар- әр түрлі кезеңдерде тексеру құру гендік- инженерлік конструкцияларын әзірлеу кезінде тест-жүйелер үшін бақылау

# 1. Секвенирлеу тарихы

- Секвенирлеу бұл – нуклеин қышқылдарының нуклеотидтік ретін анықтау әдісі. Жоғары эффективті секвенирлеу әдісінің пайда болуына көптеген әдістердің бірігуі әкеп соқты, солардың ішіне келесі әдістер жатады:
- Елеулі орын алатын әдістің бірі бұл электрофорез әдісі, бұл әдістің дамуы не бәрі 1 нуклеотид ұзындығы болатын олигомерлерді бөлуге мүмкіндік берді.
- Азотты негіздердің спецификалық химиялық модификация әдісі.
- Р 32 изотопы арқылы ДНҚ тізбегіндегі ақырғы (концевых) нуклеотидтердің радиоактивті таңбалау әдісі.
- ДНҚ тізбектерін ДНҚ полимеразамен көшіру әдісі.

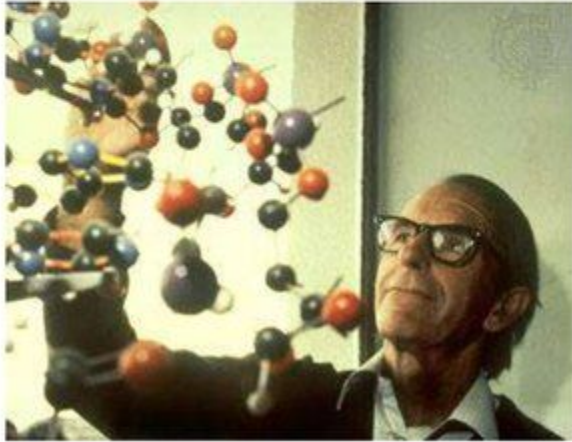
- ДНК-ның құрылымын анықтаудың көптеген әдістері белгілі, солардың ішінде Максам және Гильберт ұсынған химиялық әдіс немесе 1977 ж. Ф. Сэнгер ұсынған дидеокси әдісі. Кәзіргі уақыта басқа да жаңа әдістер ашылуда мысалға Шотган (Shotgun) секвенирлеу әдісі, бірақ Сэнгер ұсынған әдісі кен ауқымда қолданылады.

## 2. Сэнгер әдісі

- Сэнгер ұсынған әдісте ерекше дидезоксирибонуклеотидтер (ddNTP) деп аталатын модификацияланған нуклеотидтер қолданылады. ddNTP-тердің кәдімгі dNTP-терден кішкентай айырмашылығы бар. Олардың қантының 3-ші көміртегісінде гидроксилді-ОН тобының орнына сутегі тобы болады. ddNTP ДНҚ тізбегіне енген кезде, фосфодиэфирлік байланысқа қажетті ОН тобы болмағандықтан, тізбек ұзара алмайды; нәтижесінде тізбек терминацияланады.

- Сэнгердің дәстүрлі тәсілінде 4 бөлек реакциялық пробиркалар алынады. Әр пробиркада праймер, 4 dNTP оның біреуі радиоактивті таңбаланған және бір ddNTP болады. Праймерден жаңа тізбек синтезі басталғаннан кейін ДНҚ полимераза тізбекке кездейсоқ қалыпты dNTP-тың орнына ddNTP-ты енгізеді де, тізбек ұзаруын тоқтатады. Уақыт өткен сайын ddNTP-тер барлық тізбектерге енеді де, ұзындығы әртүрлі фрагменттер түзеді. Сэнгердің дәстүрлі тәсілінде ДНҚ тізбектерінің ажыратылуы айырмашылығы бір нуклеотид болатын фрагменттерді ажырата алатын жіңішке полиакриламидті гелде жасалады. Авторадиограммадан алынған тізбек төменнен жоғары қарай оқылады.

# Секвенирование по Сенгеру (Золотой стандарт)



**Длина секвенирования:**

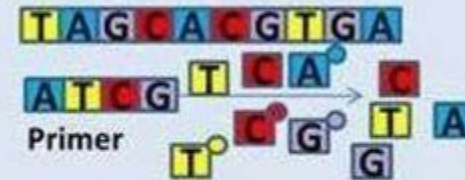
300-1000 bp

**Ошибки:** 0.1-1%

Phi X 174 (ФХ174) бактериофаг был первым секвенированным ДНК геномом (5386 нуклеотидов) в 1977 году

## B Sanger Dideoxy Sequencing

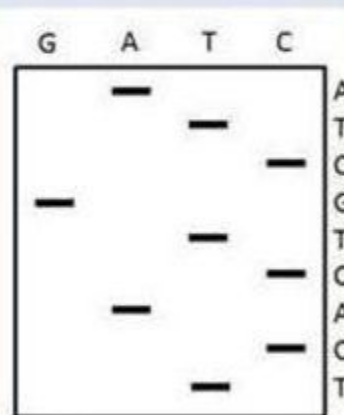
1. Four DNA synthesis reactions incorporating chain-terminating dideoxy nucleotides lead to ending of the sequence at each A, T, C or G each labelled with a separate nucleotide.



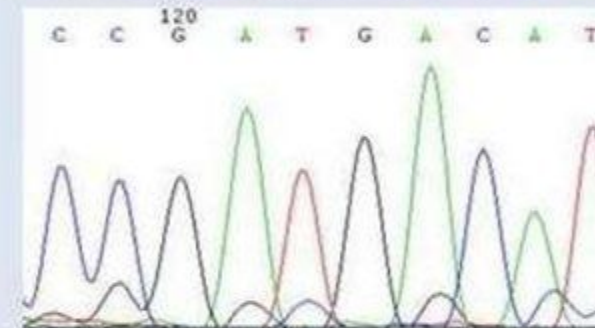
2. Each reaction thus generated fragments of increasing size, ending at the base specified by the reaction i.e. each A, T, C or G.



3. Fragments resolved on a gel or automated sequencing machine.



Polyacrylamide Gel

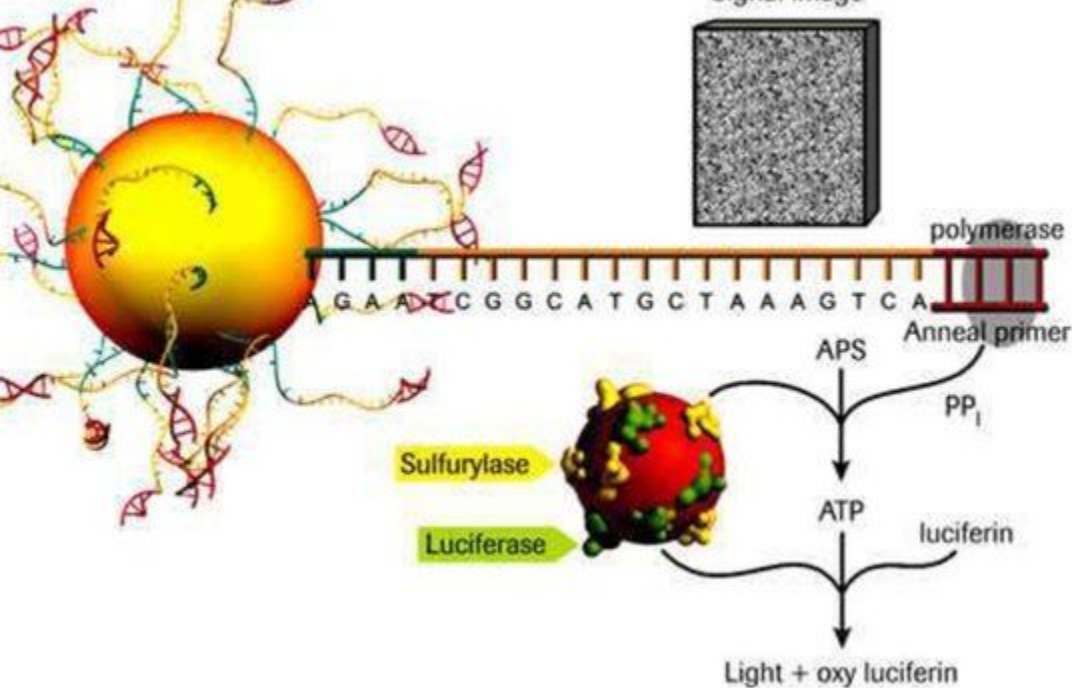


Sequencing trace from ABI Prism 313 genetic analyser, which separates the DNA fragments by size and reads the fluorescence at the end of each fragment (which comes from the chain terminating nucleotide).

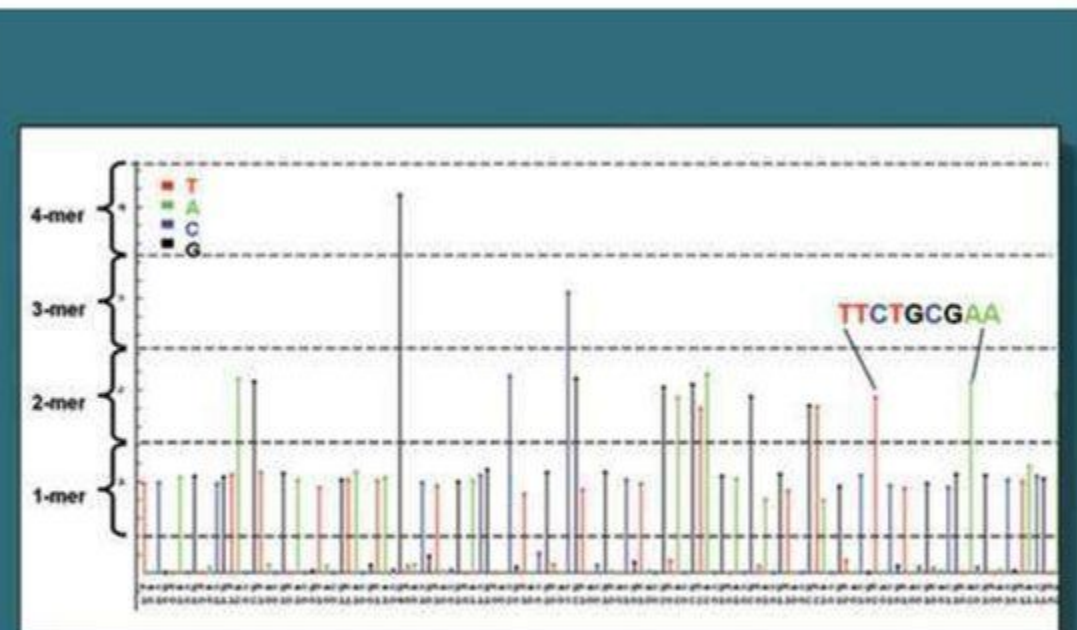


## ДНК секвенерлеу әдісінің қолдануы:

- Геномдық анализ
- Медицина
- Микороганиздердің метагеномикалық  
анализы



Секвенирование начинается с присоединения праймера, потом присоединение комплементарного нуклеотида приводит к высвобождению пирофосфата, который взаимодействуя с сулфирилазой и люциферазой приводит к образованию светового сигнала, детектируемого камерой.



По интенсивности сигнала определяется какое количество нуклеотидов присоединяется. При этом зная какие нуклеотиды подаются в текущее время определяют последовательность ДНК.

# Қорытынды

- ДНК секвенерлеу барлық жерде қолданылады
- Дидеокси әдісі (Сэнгер әдісі)
  - Дәл нәтижелер
  - ДНК-нің кішкентай фрагменттеріне қолданылады
- Геномның толық секвенерлеу
  - Адамның геномын секвенерлеуге қолдануға болады
- Пиросеквенерлеу
  - Синтездік секвенерлеу
  - Дәл және тез нәтижелерін береді

# Пайдаланылған әдебиеттер

- <https://ppt-online.org/608597>
- <https://ppt-online.org/685532>
- <https://present5.com/dnk-sekvenirleu-%D3%99disi-dnk-sekvenirleu-%D3%99disi/>
- <https://ppt-online.org/292957>
- <https://ppt-online.org/438318>