

Příloha č. 4

Princip metody Sangerova sekvenování

Metoda vyšetření:	Sangerovo sekvenování
Sekvenátor:	ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)

Princip metody:

Sangerova metoda se používá k sekvenování krátké sekvence jednovláknové DNA. Ve své podstatě využívá biologického procesu replikace DNA. Vybraná sekvence DNA se vloží do reakční směsi, jež obsahuje primer, DNA polymerázu (Taq či T7 polymeráza), zásobu čtyřech esenciálních deoxyribonukleotidů (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) a čtyři fluorescenčně značené terminátory reakce - dideoxynukleotidy. Dideoxynukleotid je schopen se začlenit do replikující se DNA, ale následně zastaví elongaci řetězce, protože nemá OH skupinu, na níž by se připojil další nukleotid. Výsledkem je směs různě dlouhých sekvencí DNA, které končí daným dideoxynukleotidem. K separaci řetězců dochází pomocí kapilární polyakrylamidové elektroforézy na automatickém analyzátoru s laserem indukovanou detekcí fluorescence. Pořadí jednotlivých bází je následně vyhodnoceno z hrubých fluorescenčních dat ve čtyřech barevných kanálech pomocí speciálního softwaru.

Limitace metody:

Tato metoda je použitelná pouze pro sekvenování fragmentů DNA o délce 150-1000 nukleotidů v jedné reakci a pro varianty přítomné alespoň ve 20 % molekul.