

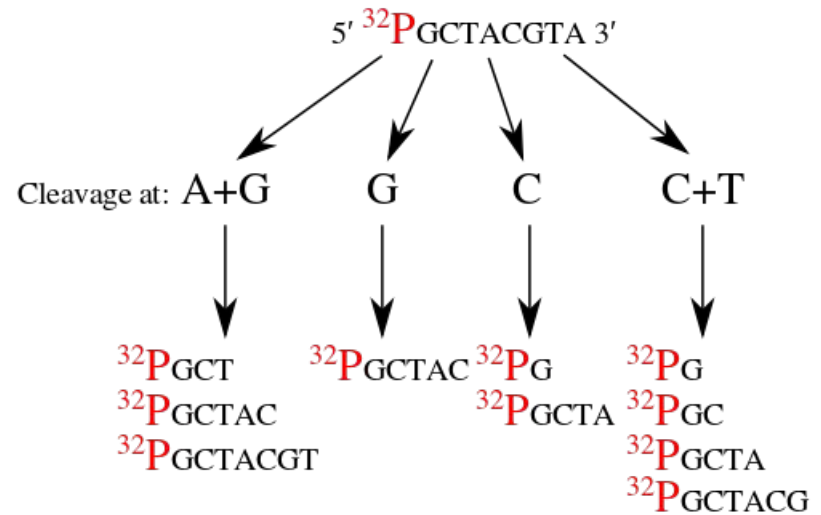
NGS

Выполнила:  
магистр I курса  
Фарофонова В.В.

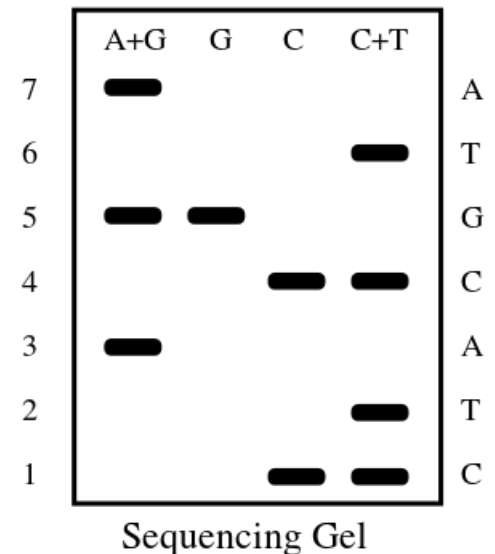
2017

# Метод Максама-Гилберта

- Гидролиз по разным основаниям/сочетаниям оснований
- Электрофорез
- См. рисунок 1

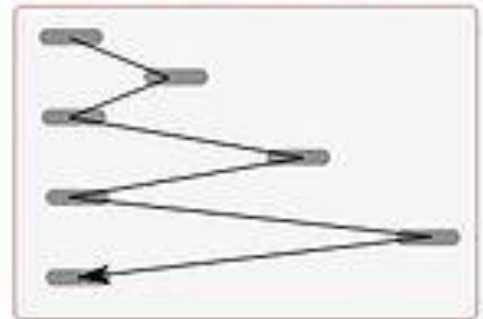
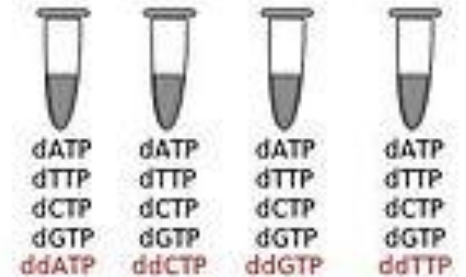


Метод основан на химической дегградации, предложен в середине 70х. Сложен и опасен.



# Метод Сенгера

Метод основан на прерывании элонгации. Каждый тип ддНТФ помечен флуоресцентной меткой, отличающейся по спектру излучения В конце 50-60 раундов амплификации имеем молекулы разной длины, разделяющиеся в геле по размеру.



секвенирующий гель-электрофорез

Первоначально использовали радиоактивные изотопы в ддНТФ и проводили реакции в разных пробирках. Сейчас используют флуоресцентные красители. Капиллярный секвенатор по Сенгеру даёт 800-1000 нуклеотидов за прочтение.

# Гибридизация на твёрдой фазе (секвенирование путём гибридизации)

- На чип нанесены синтетические олигонуклеотиды известной последовательности (например 65 536 сочетаний для длины в 8 оснований) в известных местах.
- Реакцию проводят с меченой одноцепочечной ДНК, разрушенной до коротких фрагментов.
- Последовательность узнают считывая положение метки на чипе (последовательность олигонуклеотидов в конкретных точках известна) и собирают в длинные используя перекрытие нуклеотидов.

Сложно подобрать условия реакции, при которых связывались бы только полностью комплементарные последовательности. Полагаю, что синтез олигонуклеотидов и их точечное закрепление если и не дорого, то трудозатратно. Однако, разработанные для этого метода алгоритмы легли в основу высокоскоростной сборки и выравнивания последовательностей для NGS.

# MALDI-TOF масс-спектрометрия

- Гомогенный фрагмент ДНК высушивают на поверхности «мишени»
- Облучают УФ-лазером
- Ионизированные молекулы ДНК переходят в газовую фазу и разгоняются в электрическом поле
- В зависимости от веса и заряда до датчика молекулы долетают с разной скоростью
- На основании полученных данных может быть вычислена масса и расшифрована последовательность коротких молекул.

Первоначально (и сейчас) метод использовался для белковых молекул. Из-за такой себе производительности в коммерческих целях не используется.

# Секвенирование

## Лигированием

Если кратко, то цирк с конями.

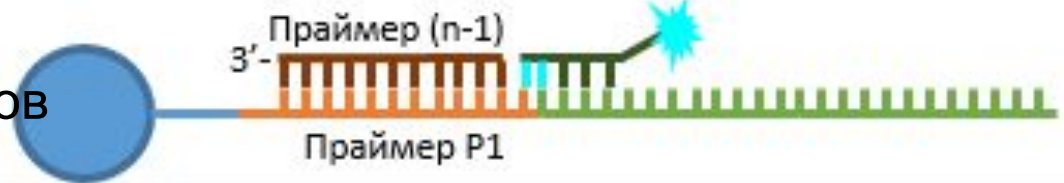
1.



3.



4.



- Заякориваем последовательность на бусине, эмульсионная ПЦР
- К праймеру, которым заякорена ДНК прижигается затравочный праймер
- Добавляется олигонуклеотид с известным положением 1-2 нуклеотидов и флуоресцентной меткой и лигазой
- Фиксируем результат
- Отрываем метку
- Повторить n раз
- Отрываем всё, что насинтезировали и добавляем затравочный праймер на 1 нуклеотид короче и снова проводим несколько сеансов лигирования

Цирк с конями. Реализован платформой SOLiD. Долго, но почти без ошибок.

# Пиросеквенирование

Дорогой цирк с конями.

- Заякориваем ДНК при помощи праймера (адаптера с известной последовательностью) на бусины
- Нарабатываем копии (эмульсионная ПЦР)
- Помещаем в отдельные лунки с кучей дорогих ферментов, которые будут реагировать на образующийся в ходе реакции присоединения дНТФ пирофосфат высвечиванием кванта света
- По очереди промываем разными нуклеотидами и фиксируем свечение

Хорошая производительность, относительно быстро, но люто дорого в использовании. Реализовано компанией Roshe. (частично уже снято с производства, мухахаха, прибор Junior)

# Обратимые терминирующие нуклеотиды

Концепция секвенирования синтезом.

- Бусины, ПЦР, всё как обычно
- К полученным библиотекам (обсаженная одинаковыми копиями ДНК бусина) добавляют RT-нуклеотиды (с флуоресцентной меткой и 3'-концевым блокатором)
- Добавили смесь нуклеотидов, подождали, смыли, зафиксировали свечение
- Химическим путём удалили метку и блокатор и повторили снова

Возможность обработки огромных массивов данных, но долго и с небольшими ошибками, что компенсируется возможностью многократного перекрытия. Реализовано Illumina и Pacific Bioscience.



# Полупроводниковое секвенирование

Метод основан на регистрации ионов  $H^+$ , выделяющихся в среду при присоединении к цепи очередного нуклеотида.

- Бусины с библиотеками в лунки
- Затравки, комплементарные адаптерам
- Промываем нуклеотидами по очереди
- При присоединении нуклеотида выделяется не только пирофосфат, но и протон, что можно зафиксировать как изменение pH

Дешёвый и простой как стул детектор (с оптикой много возни, а здесь она не нужна). Самая низкая себестоимость секвенирования, быстро и много, но с ошибками. И длина ридов до 200 нуклеотидов, что ну так себе. Реализовано компанией Life Technologies Thermo Fisher Scientific, прибор – Ion Torrent.

# Детекция сигнала от одиночной молекулы ДНК

Избавление от стадии амплификации упрощает и удешевляет методику, а так же нивелирует искажение исходного материала множественным копированием. Однако, это требует очень чувствительные датчики. NGS третьего поколения.

# Секвенирование при помощи электронного микроскопа

Я даже не знала о таком цирке с конями. Чего только не пробовали:

- Сканирующая микроскопия
- Просвечивающая микроскопия
- Сканирующая просвечивающая микроскопия
- Сканирующая туннельная микроскопия

Пытались рассматривать при помощи тяжёлых металлов, геометрии ~~и третьего глаза~~, но из-за отсутствия воспроизводимости подобные исследования довольно быстро перестали принимать к публикации. Этим, по идее, всё сказано, но работы ведутся. Коммерческого применения, разумеется, нет.

# RT-нуклеотиды на одиночных молекулах ДНК

Всё как у Illumina, но без ПЦР.

- ДНК-полимераза прикреплена к поверхности
- Добавляем ДНК и RT-нуклеотиды
- Фиксируем наличие и длительность сигнала (актуально для повторяющихся нуклеотидов)

Гигантские риды и довольно дёшево. Куча ошибок. Если у предыдущих методов 0.1-10%, то здесь до 30%. Реализовано PacBio и HeliScore (с небольшими отличиями в способе детекции).

Впрочем, работы ведутся дальше и процент ошибок успешно снижают.

# Протаскивание ДНК через

## нанопоры

Метод основан на изменении проводимости ионного тока через нанопору в тонкой плёнке под действием электрического поля из-за протаскивания молекулы ДНК.

Проблемы в быстрой скорости проскакивания оснований и тепловых флуктуациях, а так же хрупкости мембран, из-за чего прибор не получил широкого применения.

Никакой информации о стадии разработки давно не поступало. Релиз чудо-агрегата был что-то около 2007 и обещал золотые горы, в духе размер не больше флешки, почти полное отсутствие подготовки проб и быстро-дёшево-качественно, да ещё и многократно.

# Секвенирование методом спектроскопии комбинационного рассеяния

Метод основан на том, что при комбинационном рассеянии света в спектре рассеянного излучения появляются спектральные линии, которых нет в спектре возбуждающего света. Число и расположение появившихся линий определяется молекулярным строением вещества.

Усиливая сигнал на золоте/серебре можно не только отличать нуклеотиды друг от друга, но и детектировать все их модификации.

В настоящее время разрабатывается компаниями Intel, IBM и HP.

метод	принцип	длина рида, п.н.	Цена за 1 млн п.н.	Цена прибора	время работ ы за цикл	количество ридов за цикл	«+»	«-»
454 Life Sciences	пиросеквенирование	400	10\$	500 000\$	7 часов	1 000 000	длина; скорость	стоимость; погрешность
Illumina-SOLEXA	SeqBySyn	300	0,05—0,15\$	600 000\$	9 дней	до 3 000 000 000	эффективность, стоимость	скорость
IonTorrent	ионный полупроводник	200	1\$	50 000\$	1,5 часа	до 5 000 000	стоимость; скорость	погрешность
SOLiD	на основе лигирования	35—50	0,13\$	595 000\$	9 дней	1 300 000 000	стоимость	скорость
PacBio	RT for single mol	До 40000	\$0.13—\$0.60		30 min to 4 hours	500—1000 megabases	длина прочтённых геномных участков; скорость	Умеренная пропускная способность; стоимость оборудования

А вообще перед самым секвенированием  
есть чёртова куча подготовительных  
этапов, о чём прочитаете сами/итак  
знаете.

Спасибо за внимание.