Развитие техники секвенирования

Выполнила
Васильева Л.А.
Гр.01-404
ИФМиБ

Технологии секвенирования

- 1-е поколение

Sanger sequencing

- 2-е поколение

Roche

illumina

ion torrent

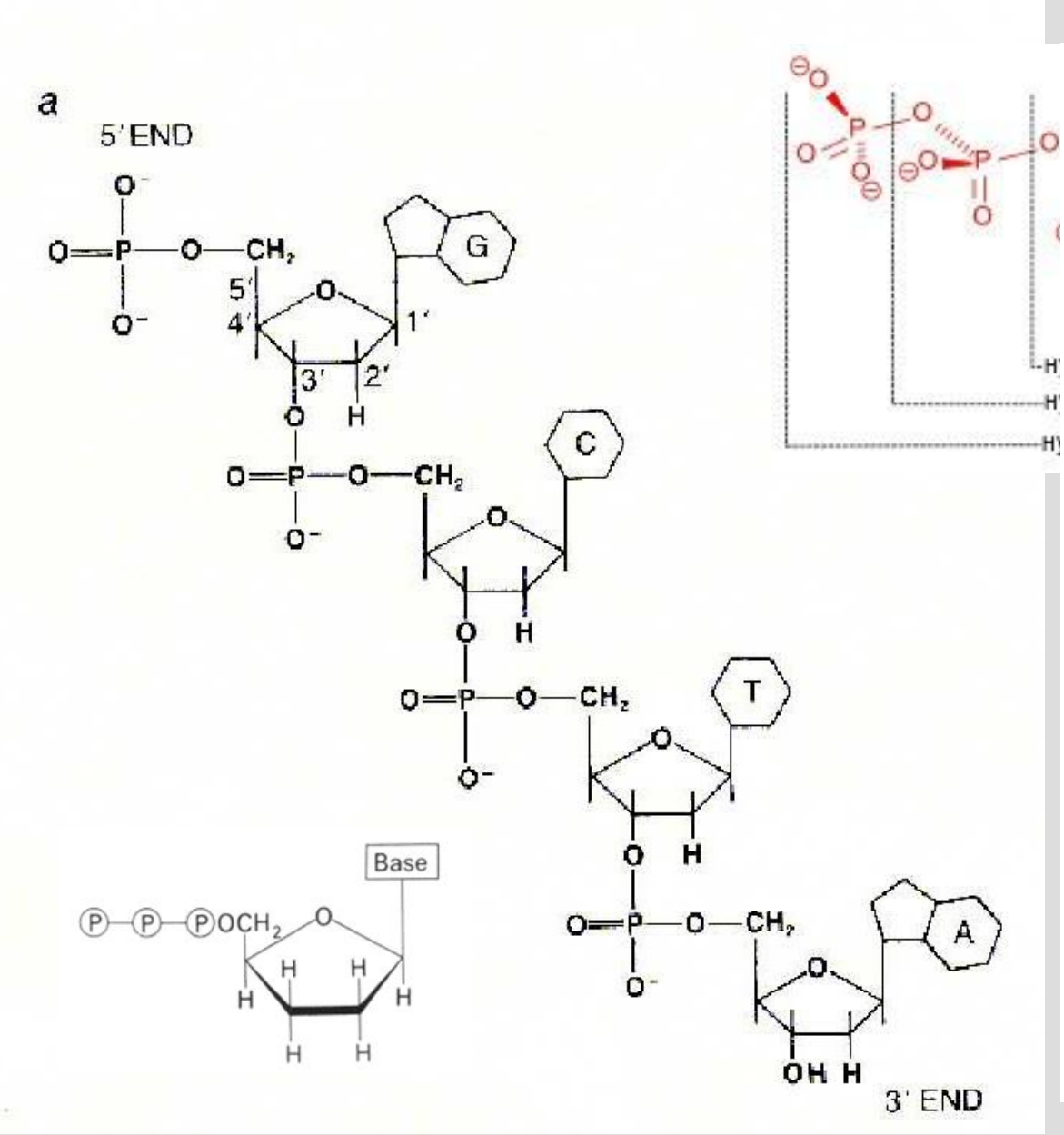
applied biosystems

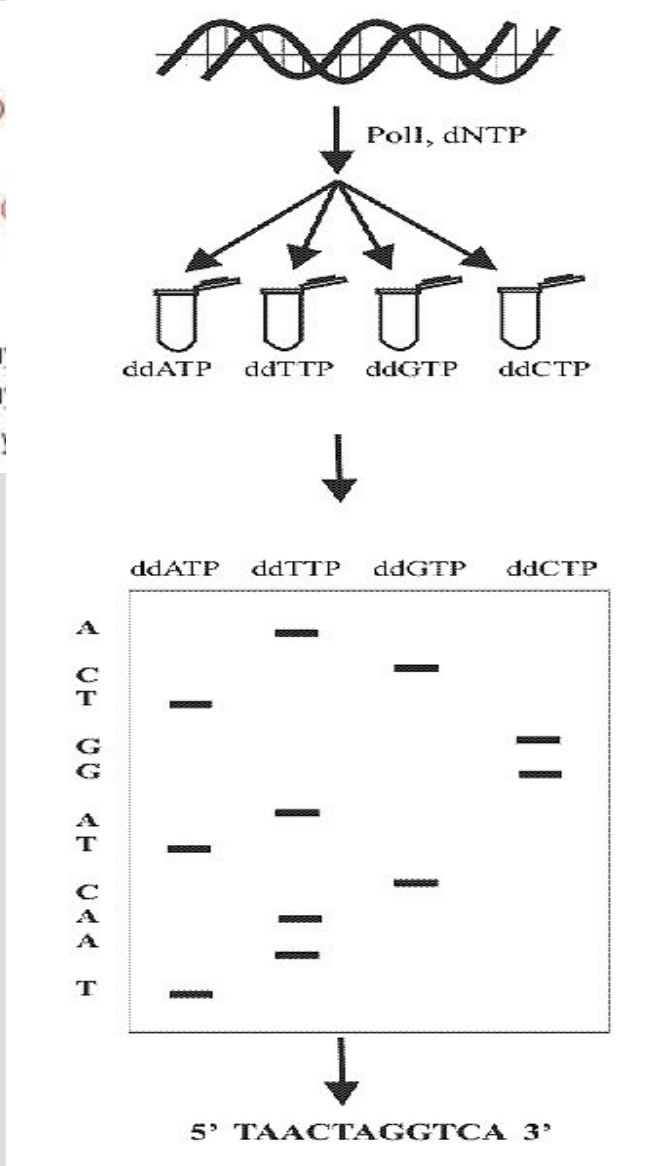
- 3-е поколение

Helicos

PACIFIC BIOSCIENCES

Секвенирование по Сэнгеру





Автоматизация секвенирования по Сэнгеру

ДНК + полимераза +

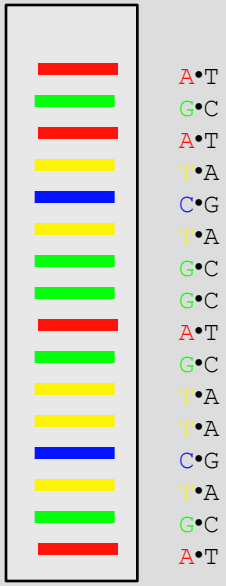
праймер +

dCTP
dTTP
dGTP
dATP
ddATP
ddGTP
ddTTP
ddCTP

полимеразная реакция с одним праймером

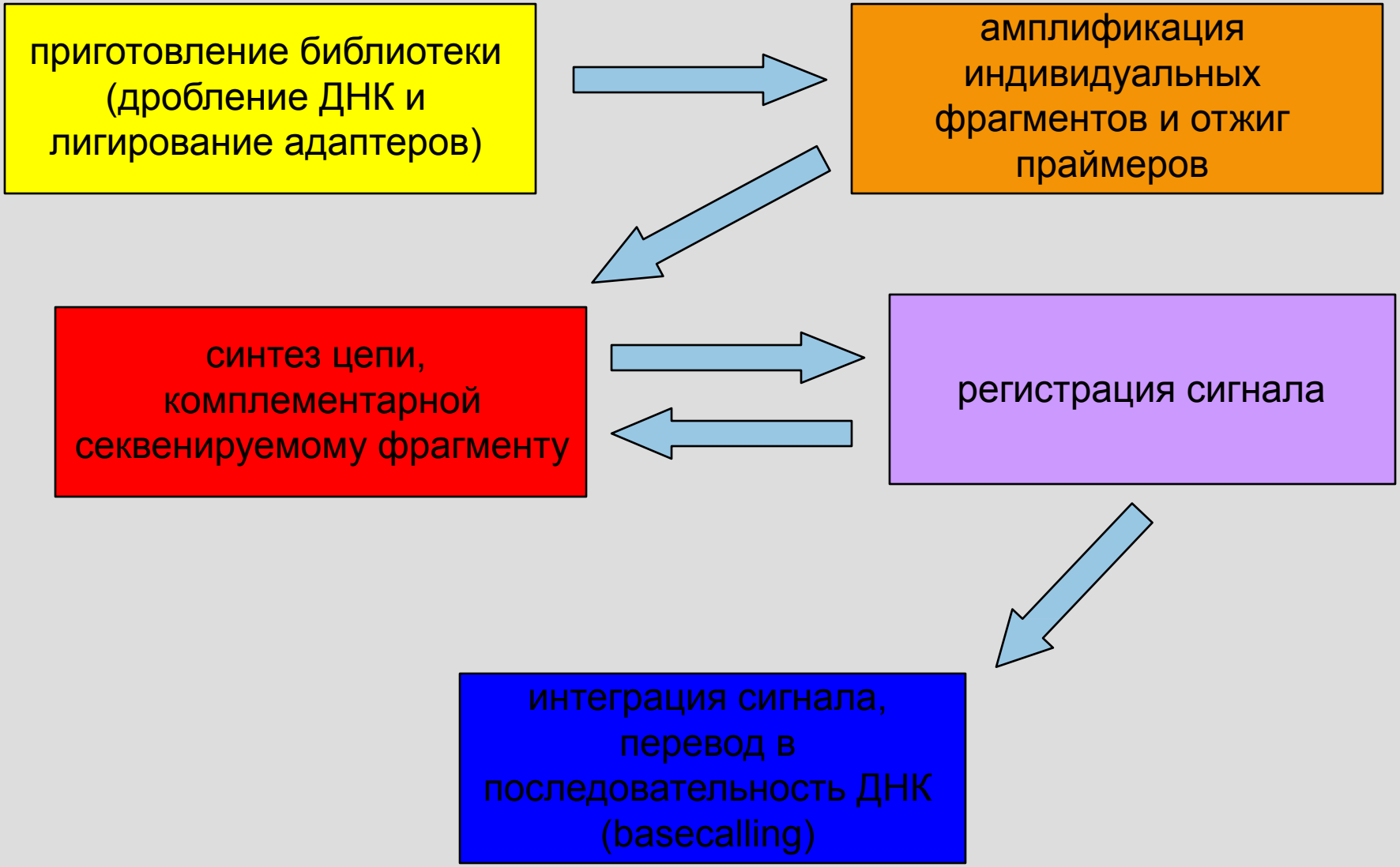
синтез

электрофорез



До 96 независимых реакций, длина чтения до 900 н. Время одного прогона ~ 40 минут

Общая схема работы NGS: от исходной ДНК до «букв» на экране



Технологии секвенирования 2 поколения: 454

Самая первая из технологий NGS (Margulies et al. Nature 2005; 441.7089)

платформа	GS Junior	GS FLX
длина чтения	400	800
число чтений, M	0.1 1	
объем данных	35 Мб 700 Мб	
цена за запуск/ цена за Мб (в $)	1 100/22	6 200/7
время работы	10 часов 24 часа	

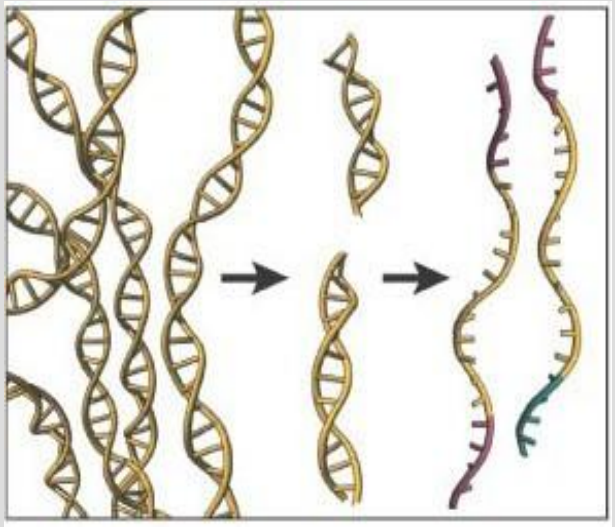
Преимущества:

- большая длина чтения (сравнимо с секвенированием по Сэнгеру)
  - короткое время работы
- наименее чувствительна к GC-составу

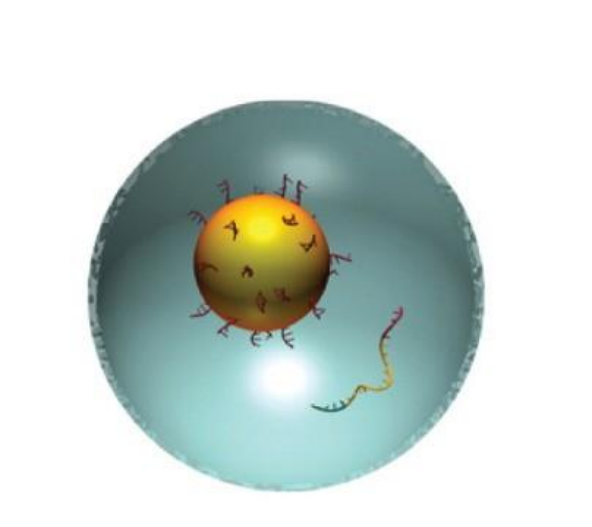
Недостатки

- неточность прочтения гомополимерных участков
- высокая цена в расчете на нуклеотид

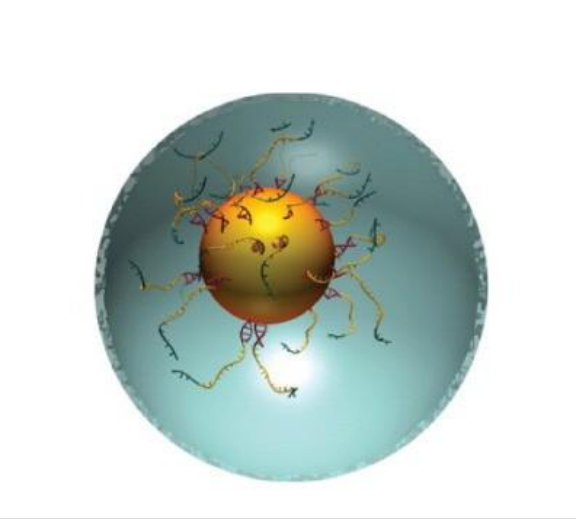
454 – принцип метода



ДНК фрагментируют и лигируют к фрагментам адаптеры

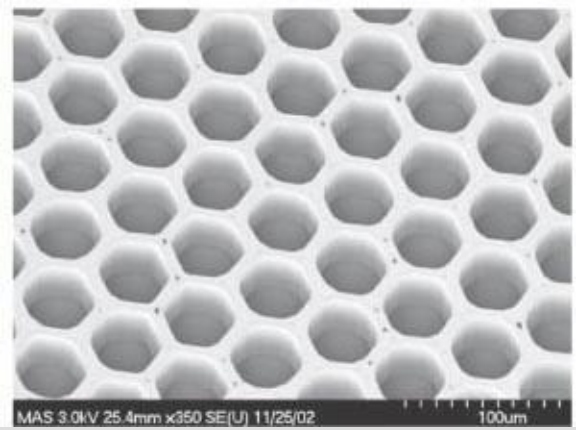


Фрагмент закрепляется на микро-шарике, покрытой олигонуклеотидами, комплементарными концам адаптера

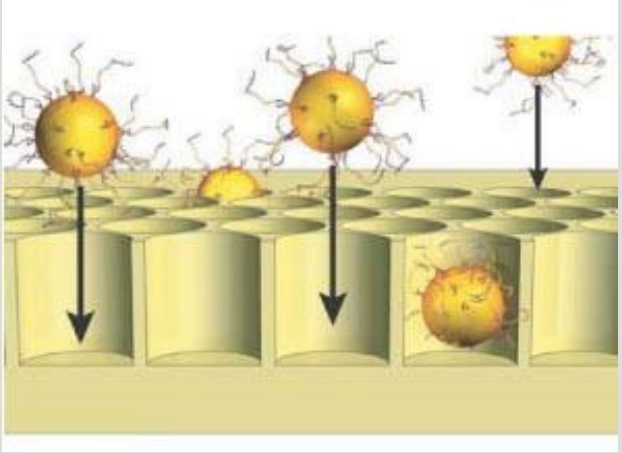


Шарики с ДНК смешивают с эмульсией, содержащей ДНК-полимеразу и dNTP и проводят ПЦР

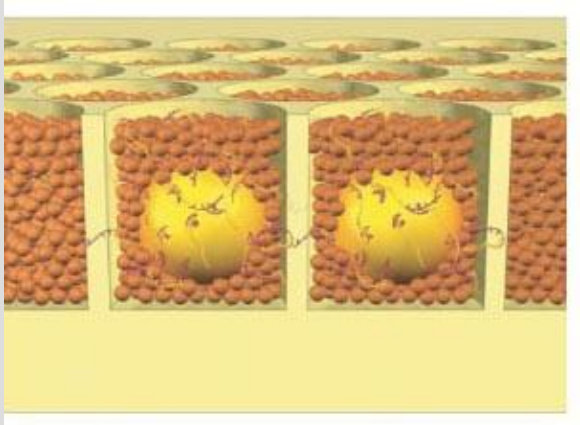
454 – принцип метода



Носитель – плашка с множеством (> 1 000 000) лунок

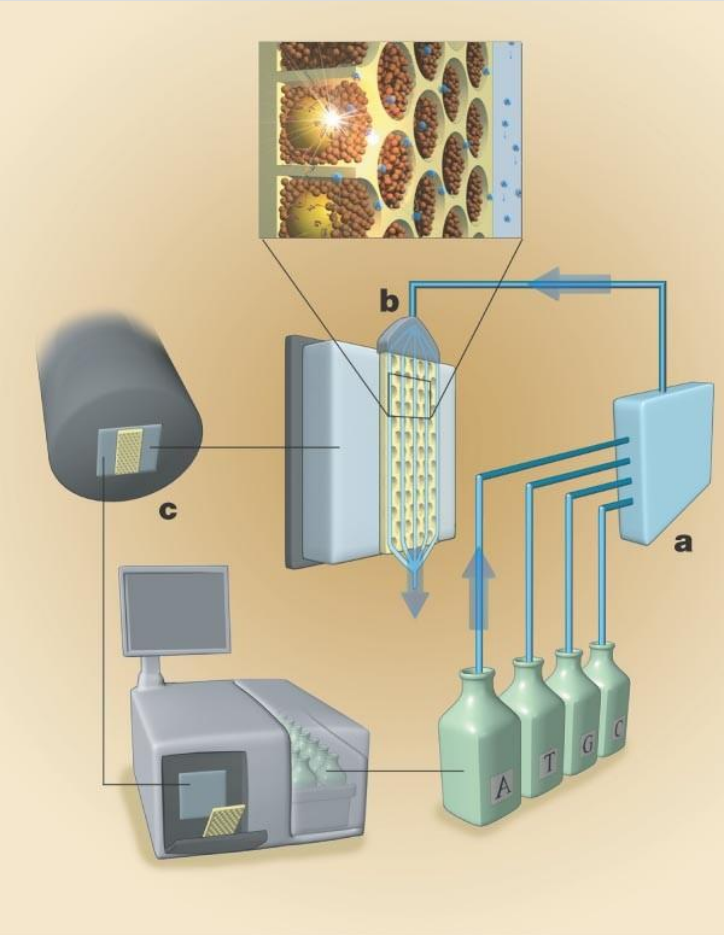


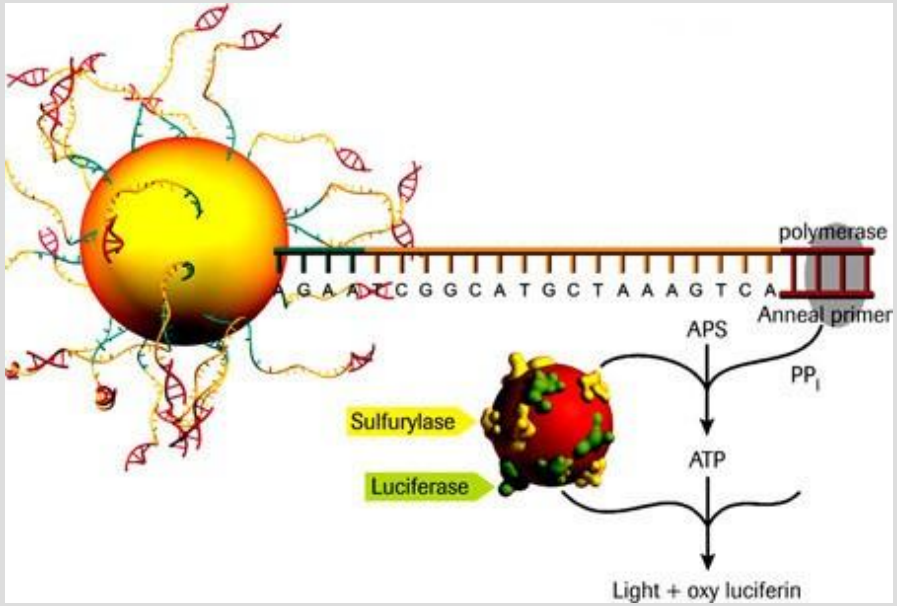
В лунки загружаются шарики, на которых закреплены фрагменты ДНК



Также в лунки помещаются частицы с закрепленными на них ферментами – АТФ-сульфурилазой и люциферазой

454 – принцип метода





Через лунки заданном порядке в реагенты (dNTP, люциферин, аденозинфосфосульфат)

При присоединении dNTP выделяется пирофосфат. Сульфурилаза преобразует пирофосфат + аденозинфосфосульфат в АТФ. АТФ используется для окисления люциферина люциферазой. Световой сигнал регистрируется фотокамерой.

Полупроводниковое секвенирование

Самая новая из технологий секвенирования 2 поколения

Сходно с 454-секвенированием, но регистрируется не свет, а pH

платформа	Ion Torrent	Ion Proton
длина чтения	до 400	200
число чтений, М	4-5.5	60-80
объем данных	2 Гб	12-16 Гб
цена за запуск/цена за Мб (в $)	939/0.60	1 000/0.02
время работы	7 часов при длине 400	4 часа

Преимущества:

- относительно низкая цена за запуск
- быстрота

Недостатки

- невысокая точность прочтения гомополимерных участков
- низкая производительность

Секвенирование путем синтеза с обратимым терминированием: Illumina

Самая распространенная из технологий NGS (~ 80% всех данных)

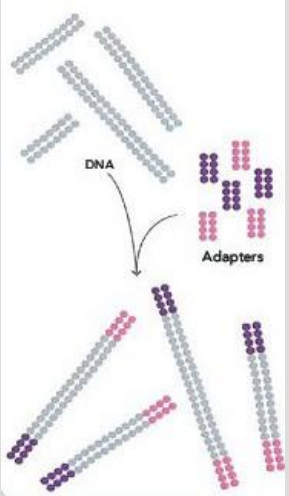
платформа	HiSeq2000	HiSeq2500	MiSeq
длина чтения	100+100	150+150	300+300
число чтений, M	2 500	600	15-25
объем данных	600 Гб	120	15 Гб
цена за запуск/цена за Мб (в $)	23 470/0.04	6 145/0.05	1600/0.14
время работы	11 дней	40 часов	65 часов

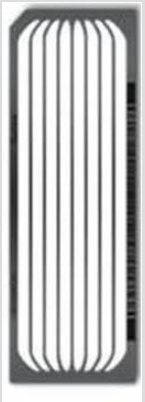
HiSeq2000 и HiSeq2500 – модификации одного и того же прибора. MiSeq существует также в варианте MiSeqDx – первый NGS-прибор, разрешенный для использования в диагностике.

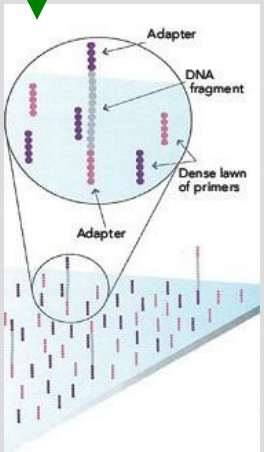
В начале 2014 г. появились два новых прибора – NextSeq500 и HiSeqX 10

Секвенирование Illumina - принцип метода

1. ДНК фрагментируют и лигируют к фрагментам адаптеры

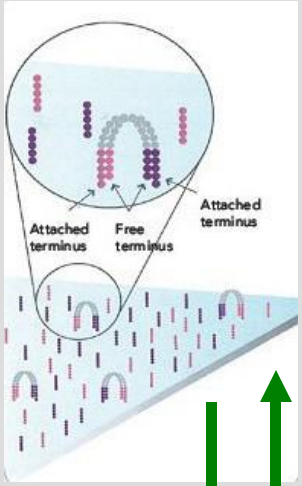


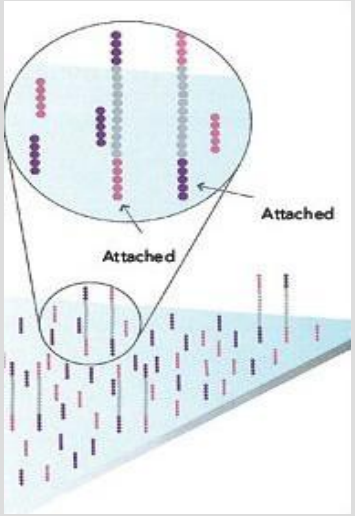




2. ДНК пропускают через ячейки, покрытые комплементарными концам адаптеров, каналы проточной

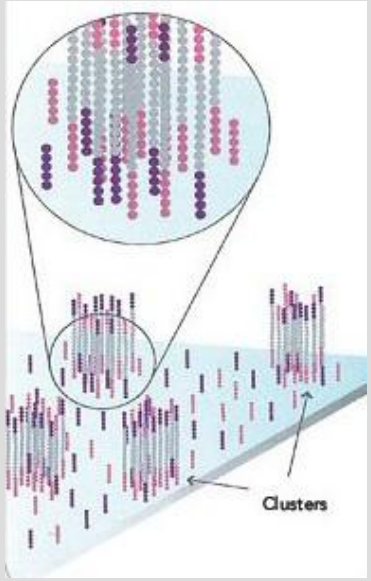
3. Через ячейку пропускают реагенты для достраивания второй цепи ДНК





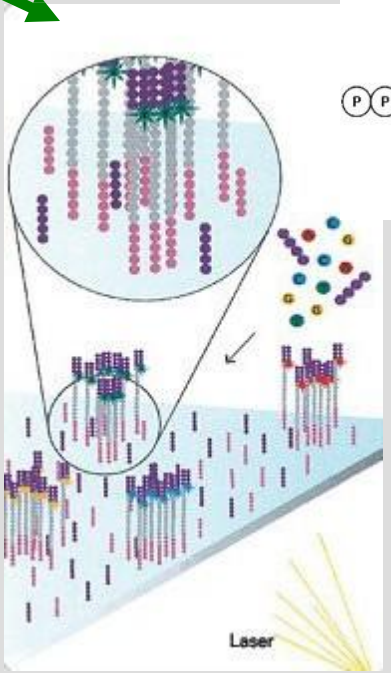
Стадии 3-4 повторяются 30-35 раз

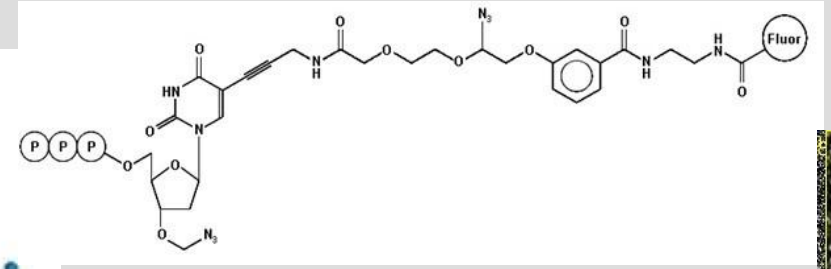
4. Денатурируют фрагменты

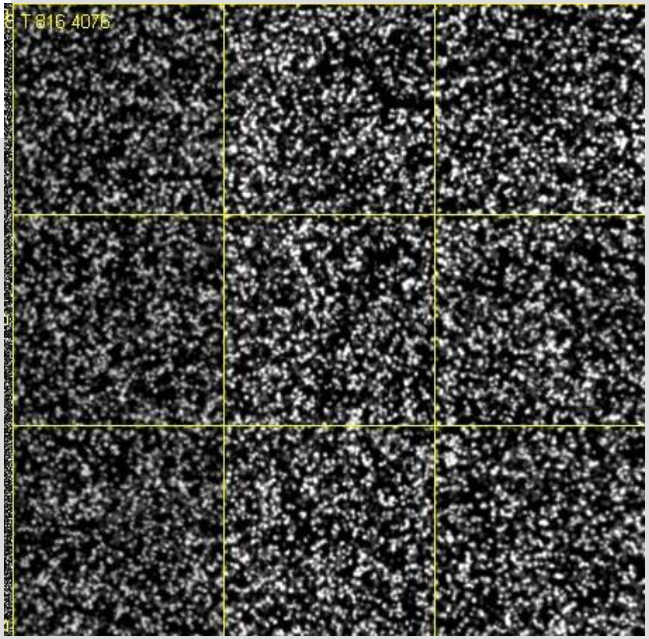


6. Каждый фрагмент оказывается окружен группой идентичных молекул («кластеры»).

Секвенирование Illumina - принцип метода







7. Через ячейку пропускают реагенты (флуоресцентно меченые терминированные dNTP и полимеразу)

8. На ячейку светят лазером и проводят съемку.

9. Через ячейку пропускают реагенты, отщепляющие флуорофор и терминатор

10. Повторение 7-9 нужное число раз (50-300). Число циклов соответствует длине чтения.

Illumina – преимущества и недостатки

Преимущества:	Недостатки
•высокая точность •универсальность •доступность ПО для обработки и анализа результатов •наименьшая цена получаемых данных (в расчете на нуклеотид)	•высокая цена реагентов •проблемы с секвенированием матриц с низкой сложностью •большая длительность прогона •ошибки в GC-богатых участках

Секвенирование путем лигирования (SOLiD)

платформа	Solid 5500
длина чтения	75+35, 60+60
число чтений, М	>1 400
объем данных	150 Гб
цена за запуск/цена за Мб (в $)	10 503/0.07
время работы	8 дней

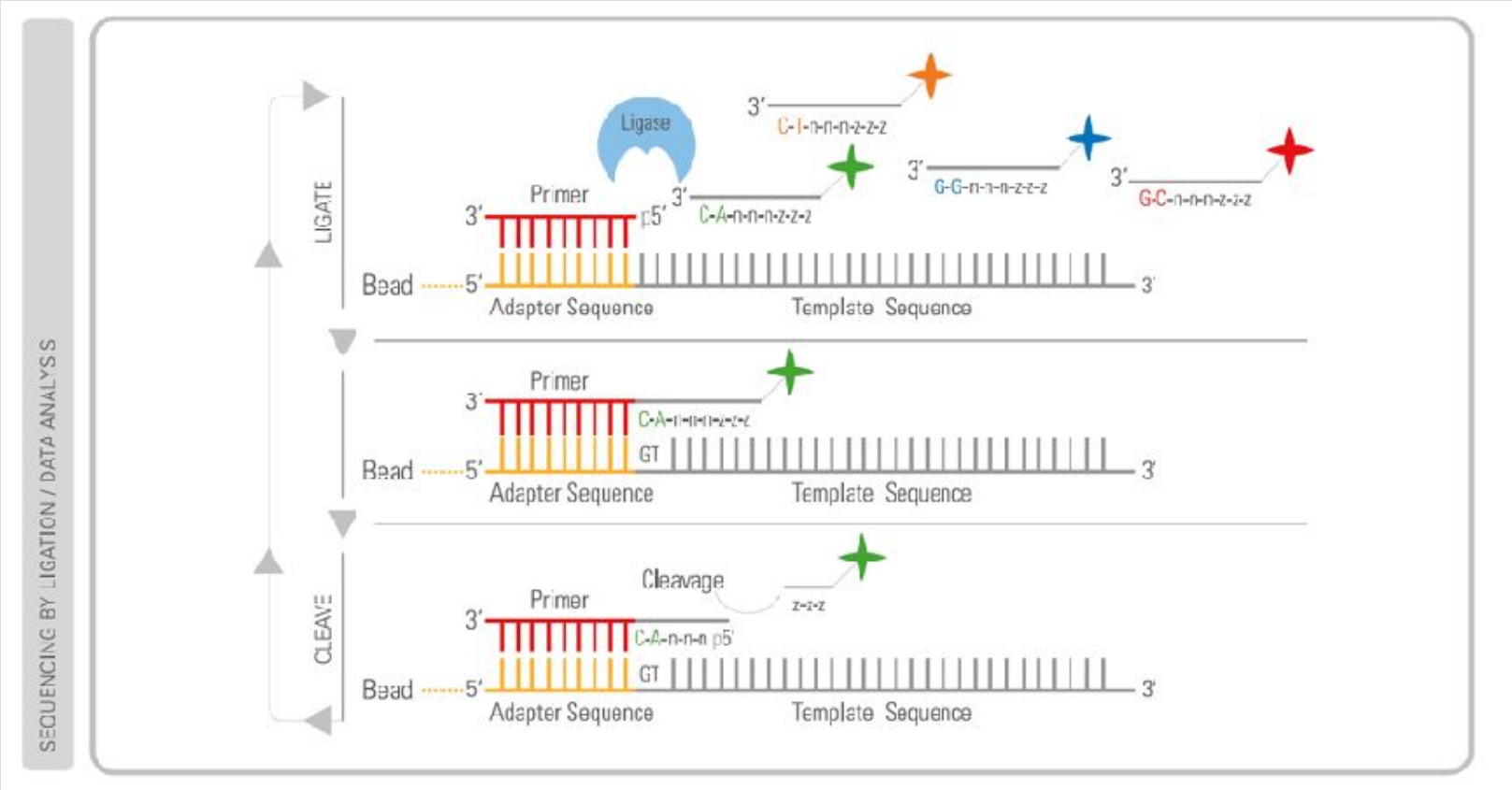
Преимущества:

- высокая точность
- возможность использовать часть дорожек на ячейке

Недостатки

- очень короткие чтения
- длительность работы
- относительно малая доступность свободного ПО

SOLiD, принцип метода



двойное прочтение каждой позиции – высокая точность

Области применения NGS

What can next generation sequencing do for you?

- **секвенирование геномов и транскриптомов de novo**

отправная точка большинства молекулярно-биологических и генетических исследований на немодельных объектах, поиск крупных геномных перестроек

- **полногеномное ресеквенирование**

поиск мутаций, ассоциированных с болезнями, картирование генов

- **направленное ресеквенирование**

биомедицина: скрининг мутаций с известной ролью в развитии болезней и поиск новых мутаций

- **анализ транскриптома**

сравнение уровней экспрессии, поиск новых генов и изоформ, аннотация de novo секвенированных геномов

- **ДНК-белковые и ДНК-ДНКовые взаимодействия**

поиск сайтов связывания транскрипционных факторов, изучение пространственной организации хроматина

- **метагеномика**

анализ разнообразия микробных сообществ

Технологии секвенирования 2 поколения: области применения

платформа/задача	454	Illumina	Ion Torrent/Proton	Solid
секвенирование de novo	+++	+++	++ для небольших геномов	-
полногеномное ресеквенирование	-	+++	++ для небольших геномов	++
направленное ресеквенировани е	+ ампликоны	++ +	++ +	++
анализ экспрессии	-	+++	++ для небольших задач	++
ДНК-белковые взаимодействия (ChIP-seq) и т.д.	-	++ +	++ для небольших задач	++
метагеномика анализ разнообразия микробных сообществ	+++ особенно 16S	+++ Miseq – 16S, Hiseq - полногеномное	+	-

Что дальше? Секвенирование единичных молекул.

Helicos
Принцип секвенирования сходен с Illumina – используются флуоресцентно меченые обратимо терминированные нуклеотиды. Пробоподготовка – фрагментация ДНК и аденилирование фрагментов; затем фрагменты закрепляются на ячейке с олиго-dT.
Небольшая (до 50 пн) длина чтения, много ошибок (3-5%). Используется для высокоточного анализа экспрессии.

Pacific Biosciences
Используется полимераза, иммобилизованная в 100-нм лунках, и флуоресцентно меченые dNTP. Возможны очень длинные чтения (> 10 000), но высокая частота ошибок (до 10%). Используется для de novo секвенирования, ошибки корректируются по данным Illumina.

Oxford Nanopore
Принцип основан на использовании мембран с белковыми нанопорами, через которые протягивается молекула ДНК. Секвенатор размером с

Спасибо за внимание!