

Развитие техники секвенирования

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

Технологии секвенирования

1-е поколение



Sanger sequencing

2-е поколение



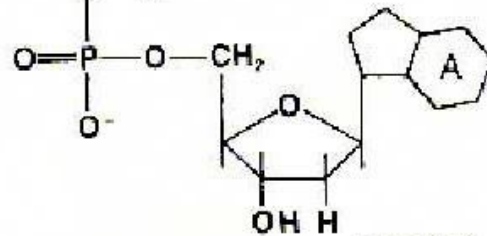
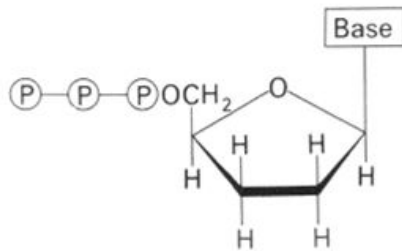
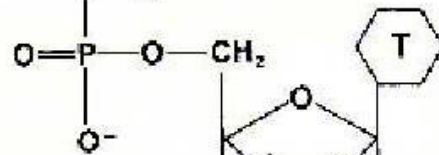
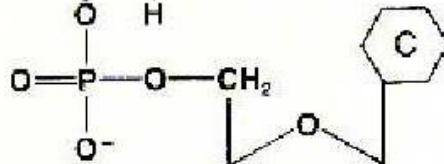
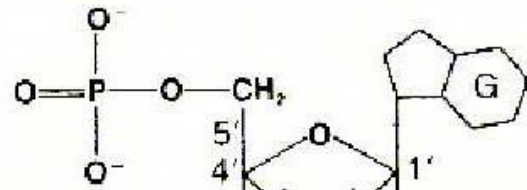
3-е поколение



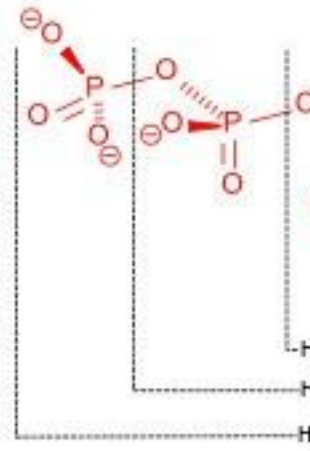
Секвенирование по Сэнгеру

a

5' END



3' END

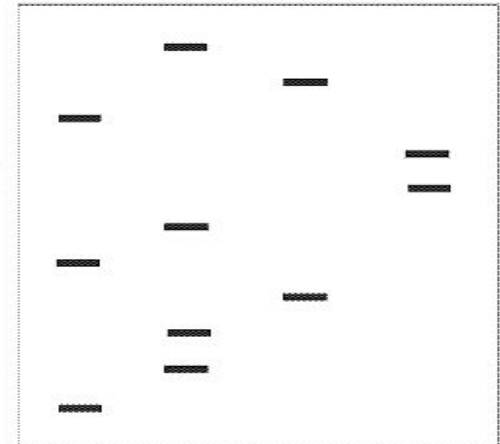


Poll, dNTP



ddATP ddTTP ddGTP ddCTP

A
C
T
G
G
A
T
C
A
A
T



5' TAAGTAGGTC 3'

Автоматизация секвенирования по Сэнгеру

ДНК + полимераза +
праймер +



dCTP
dTTP
dGTP
dATP
ddATP
ddGTP
ddTTP
ddCTP

полимеразная
реакция с
одним
праймером

СИНТЕЗ

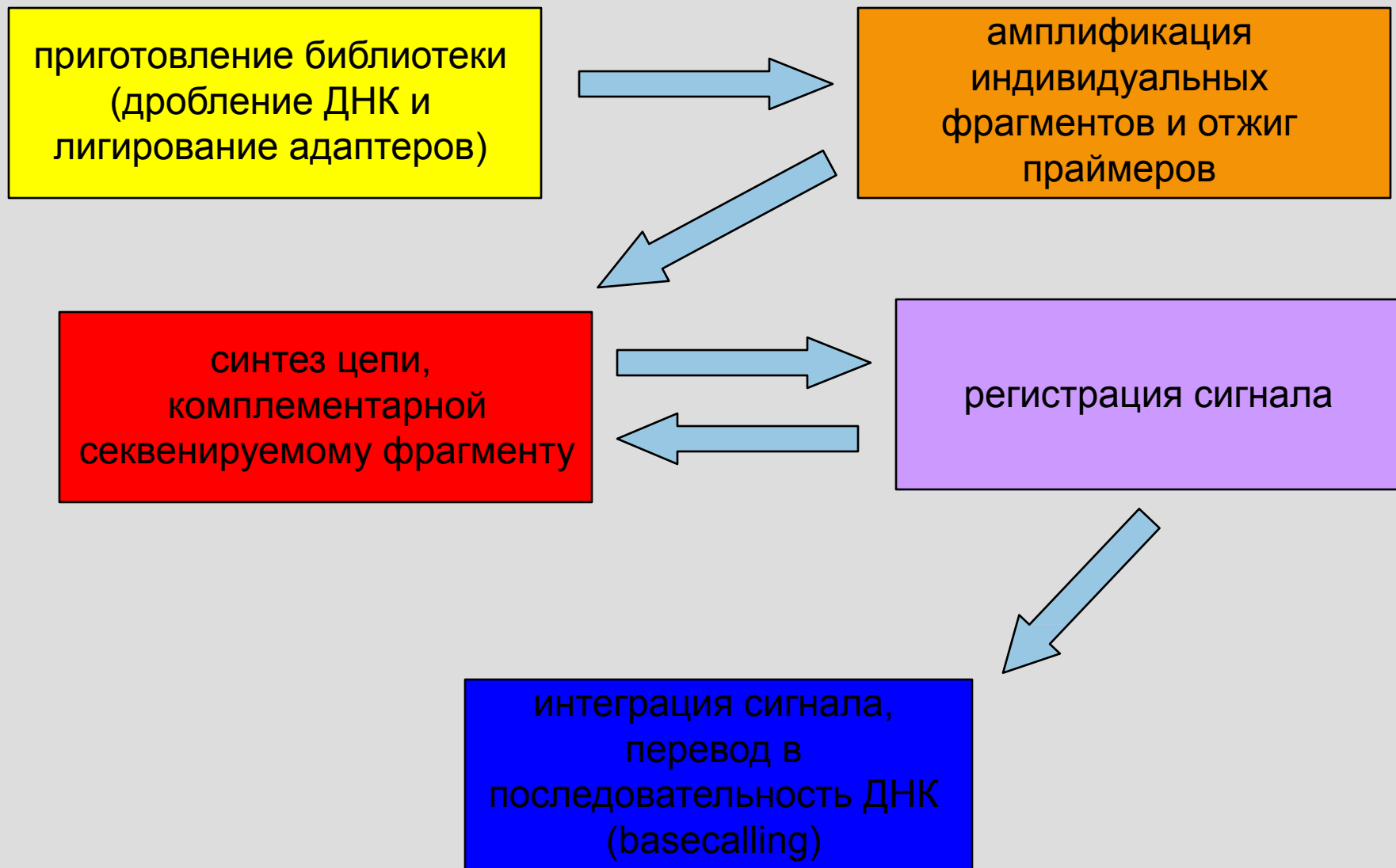
электрофорез



A•T
G•C
A•T
T•A
C•G
T•A
G•C
G•C
A•T
G•C
T•A
T•A
C•G
T•A
G•C
A•T

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, М	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

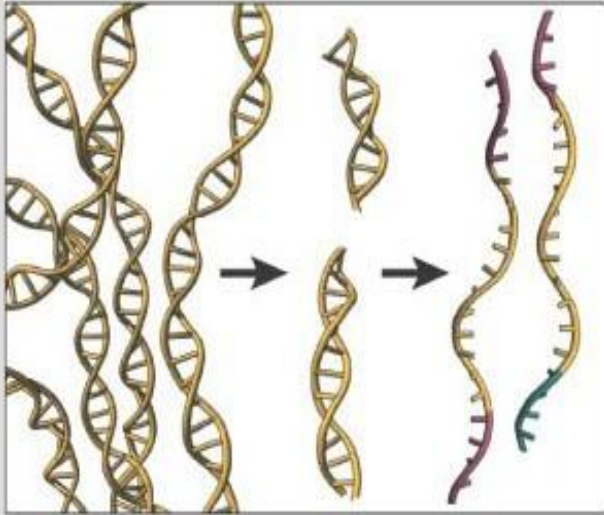
Преимущества:

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

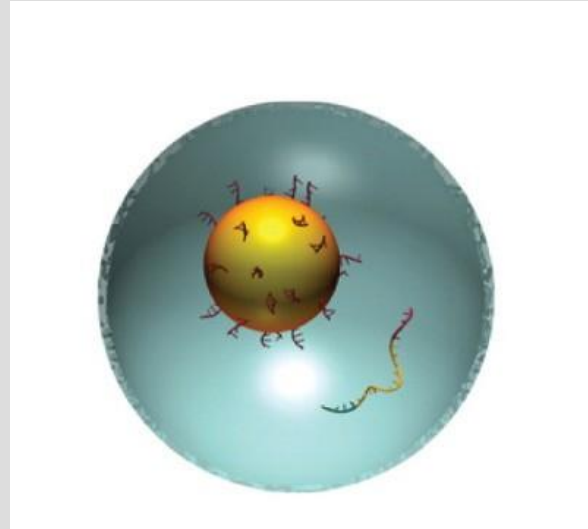
Недостатки

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

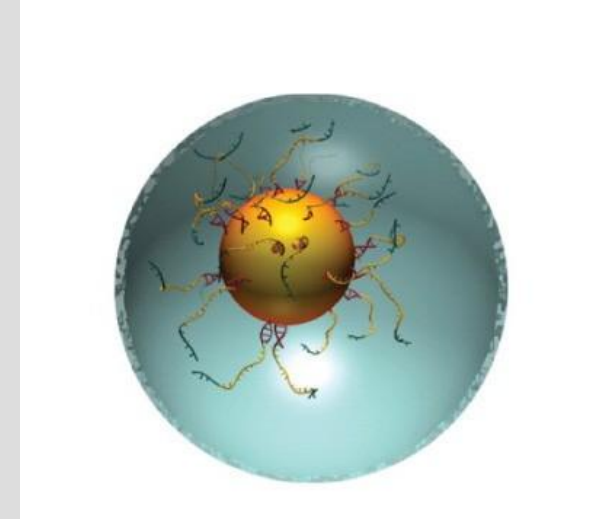
454 – принцип метода



ДНК фрагментируют и лигируют к фрагментам адаптеры

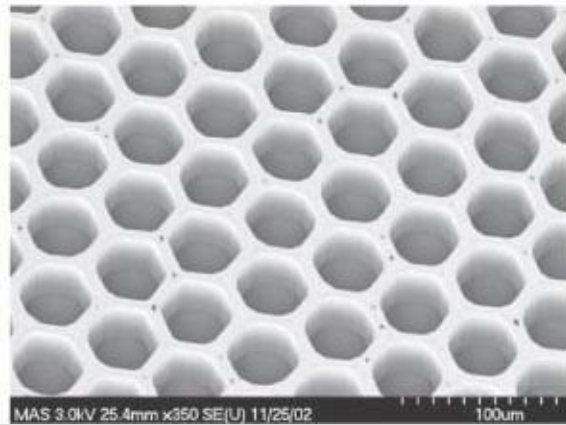


Фрагмент закрепляется на микро-шарике, покрытой олигонуклеотидами, комплементарными концам адаптера

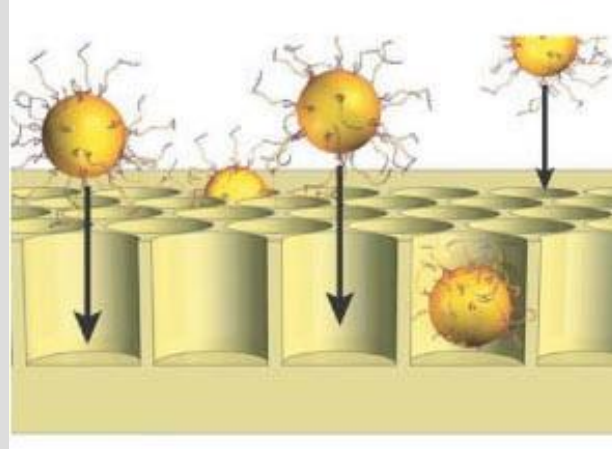


Шарики с ДНК смешивают с эмульсией, содержащей ДНК-полимеразу и dNTP и проводят ПЦР

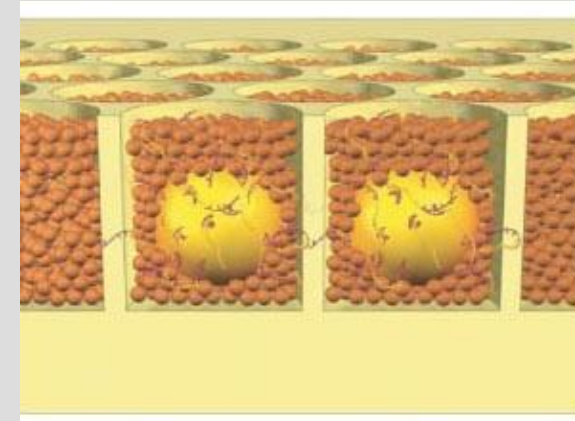
454 – принцип метода



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

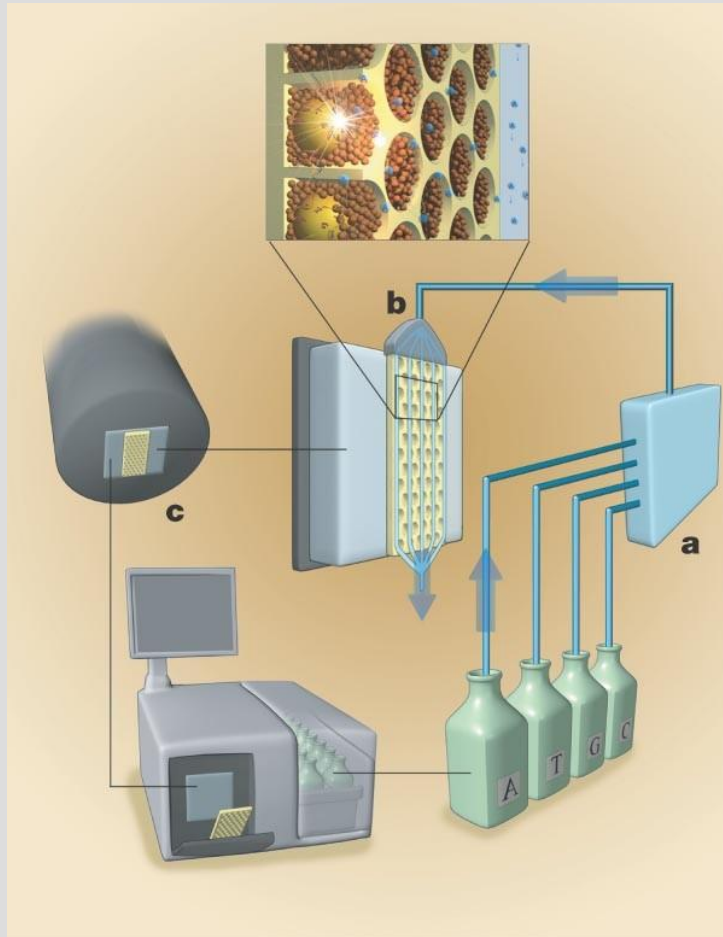


В лунки загружаются шарики, на которых закреплены фрагменты ДНК

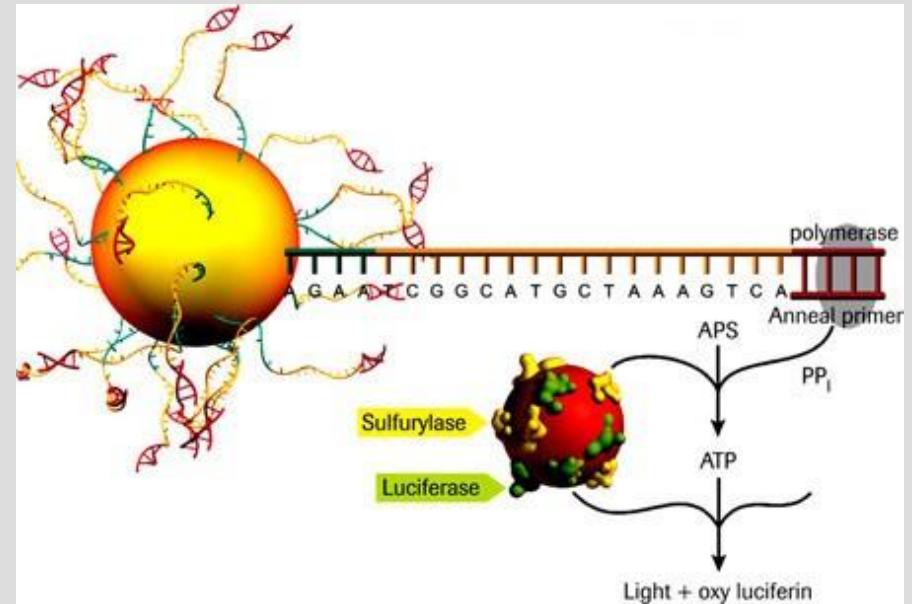


Также в лунки помещаются частицы с закрепленными на них ферментами – АТФ-сульфурилазой и люциферазой

454 – принцип метода



Через лунки заданном порядке
в реagenты (dNTP,
производитель, аденозинфосфосульфат)



При присоединении dNTP выделяется пиррофосфат. Сульфурилаза преобразует пиррофосфат + 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)

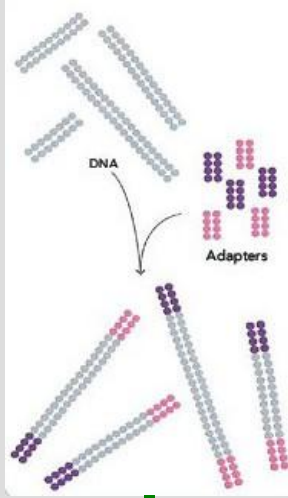
платформа	HiSeq2000	HiSeq2500	MiSeq
длина чтения	100+100	150+150	300+300
число чтений, М	2 500	600	15-25
объем данных	600 Гб	120	15 Гб
цена за запуск/цена за Мб (в \$)	23 470/0.04	6 145/0.05	1600/0.14
время работы	11 дней 40 часов	65 часов	

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

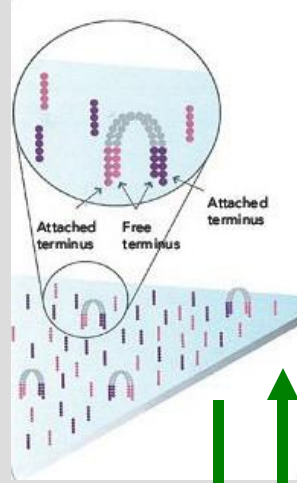
В начале 2014 г. появились два новых прибора – NextSeq500 и HiSeqX 10

Секвенирование Illumina - принцип метода

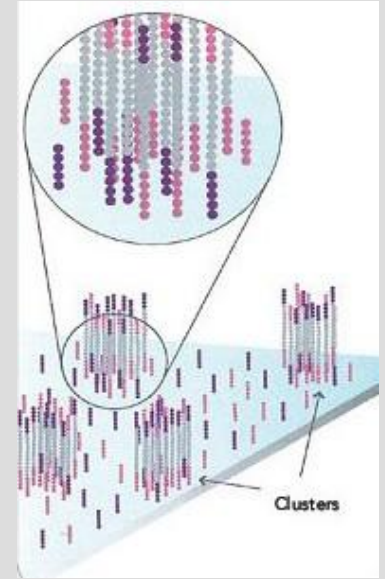
1. ДНК фрагментируют и лигируют к фрагментам адаптеры



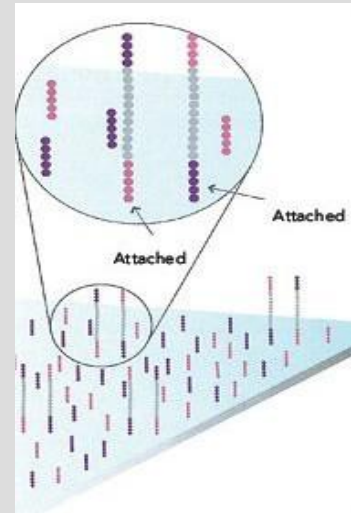
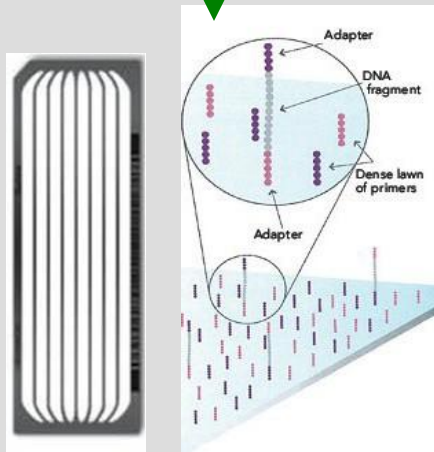
3. Через ячейку пропускают реагенты для достраивания второй цепи ДНК



Стадии 3-4 повторяются 30-35 раз



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

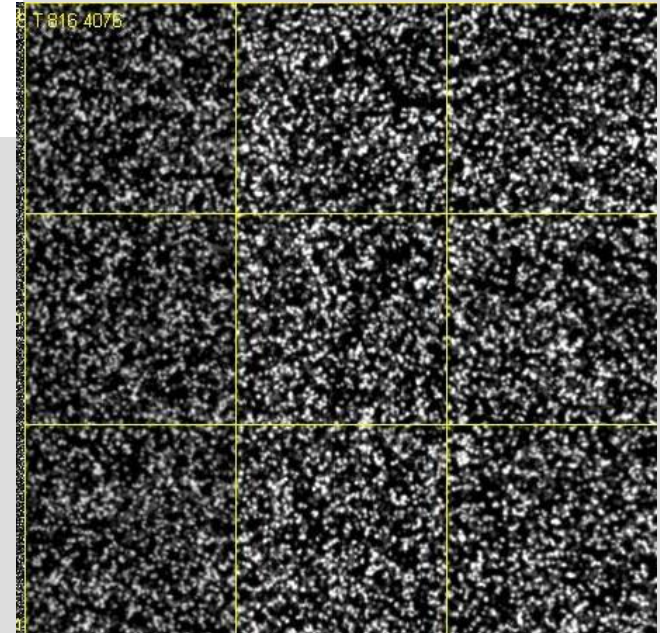
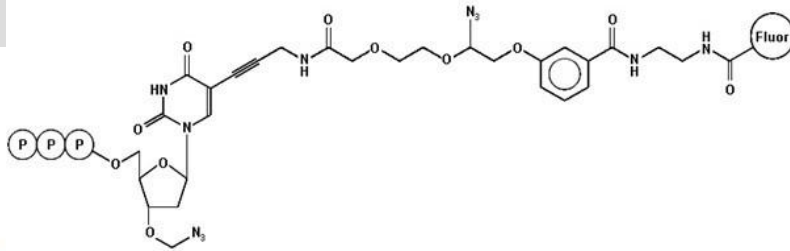
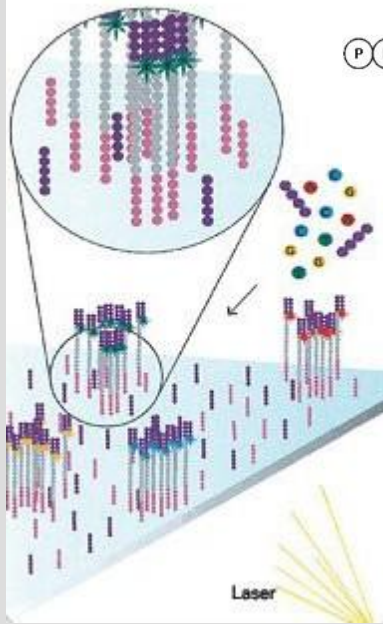


2. ДНК пропускают через каналы, покрытые элементарными фрагментами адаптеров,

4. ДНК фрагменты

фрагменты

Секвенирование Illumina - принцип метода



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

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

8. На ячейку светят лазером
и проводят съемку.

9. Через ячейку пропускают
реагенты, отщепляющие
флуорофор и терминатор

Illumina – преимущества и недостатки

Преимущества:

- высокая точность
- универсальность
- доступность ПО для обработки и анализа результатов
- наименьшая цена получаемых данных (в расчете на нуклеотид)

Недостатки

- 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:

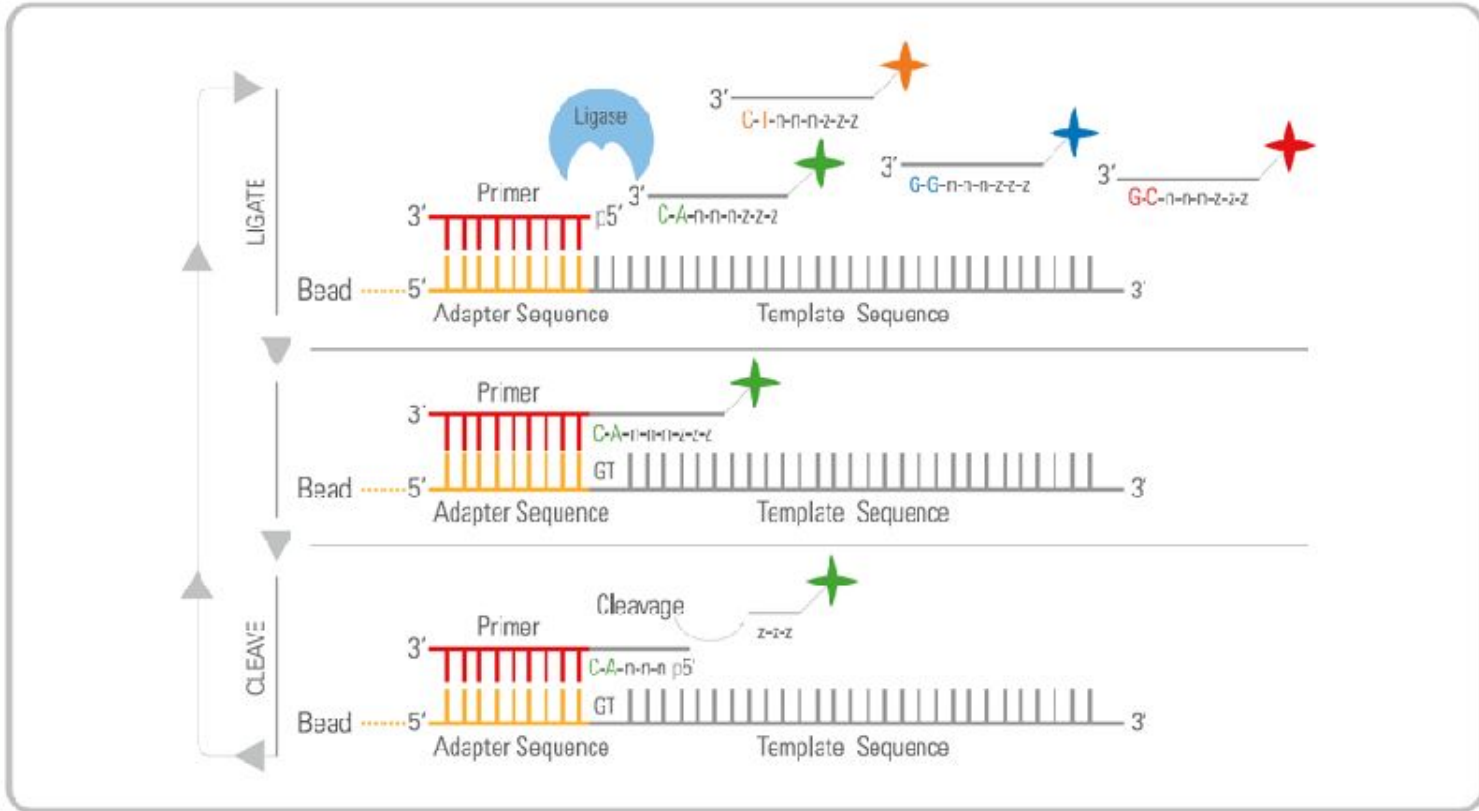
- высокая точность
- возможность использовать часть дорожек на ячейке

Недостатки

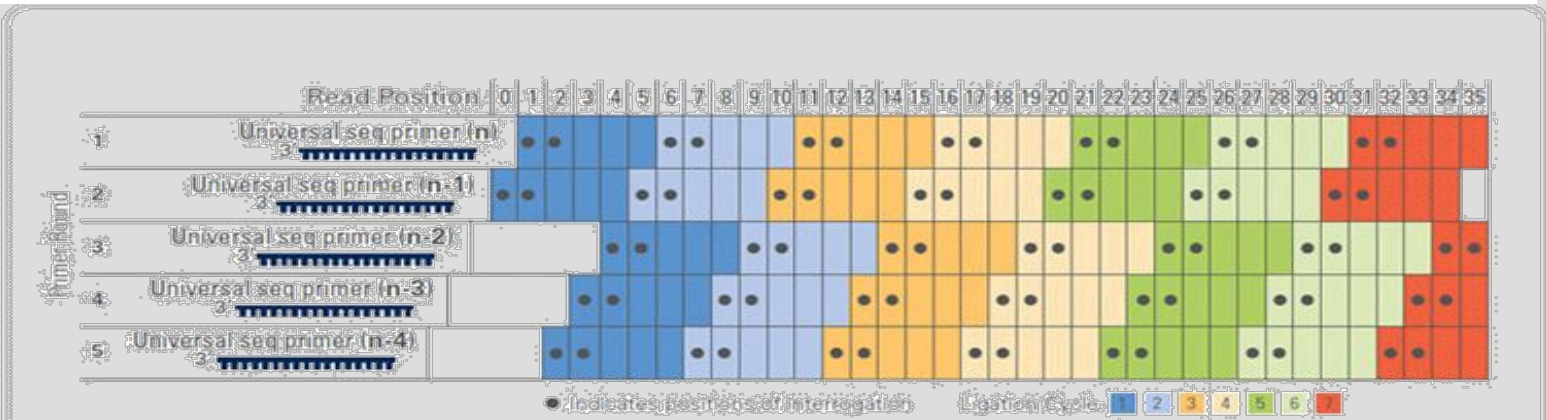
- очень короткие чтения
- длительность работы
- относительно малая доступность свободного ПО

SOLiD, принцип метода

SEQUENCING BY LIGATION / DATA ANALYSIS



DUAL INTERROGATION OF EACH BASE



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 ресеквенирование	+ 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 полимеразы, 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!