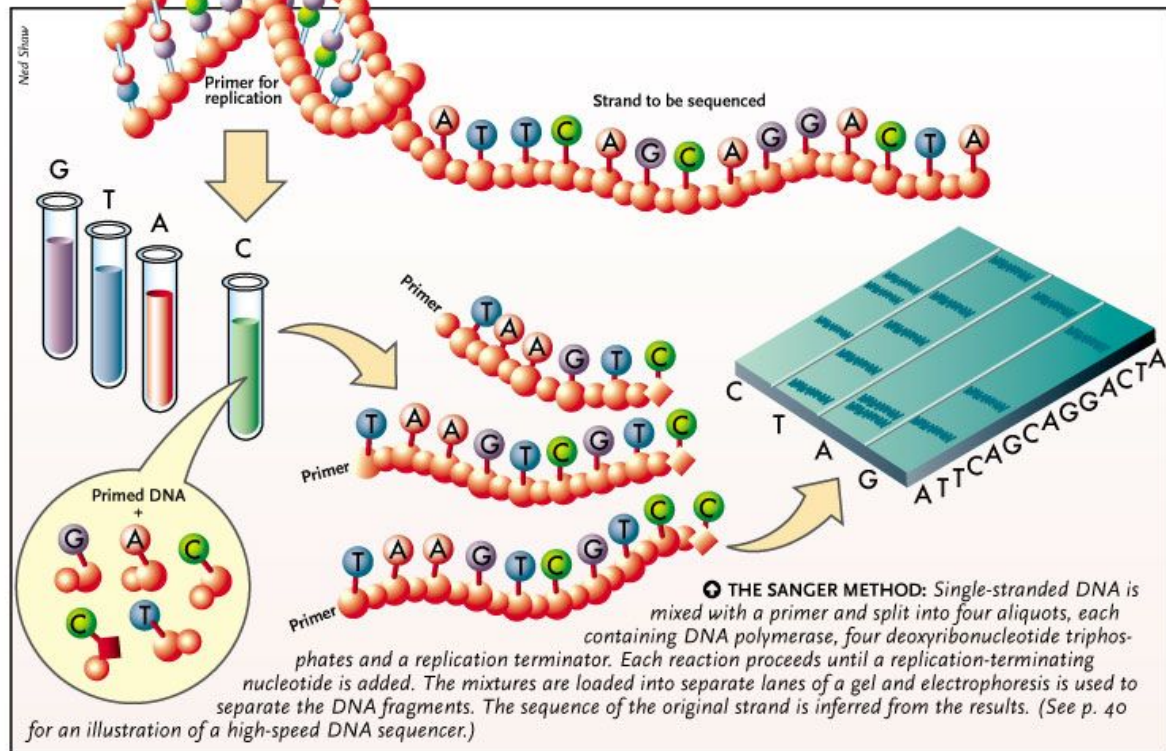
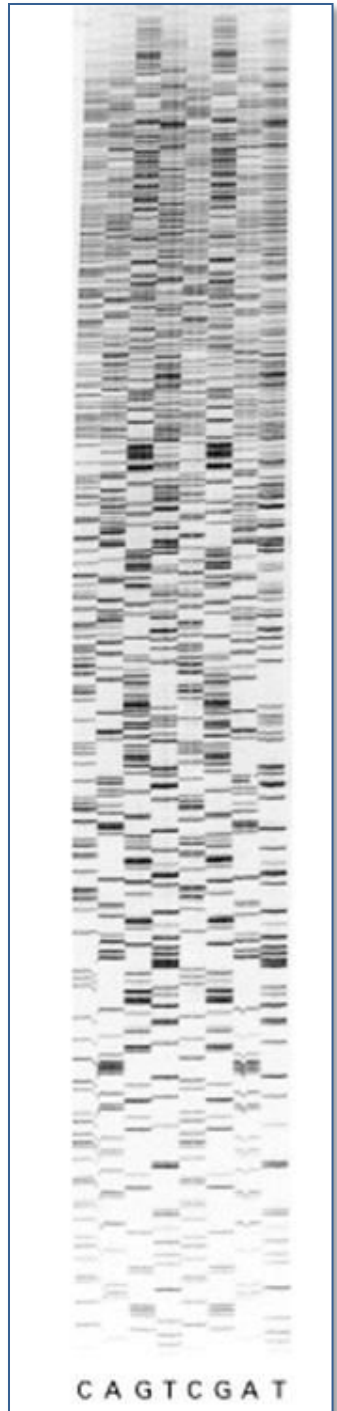
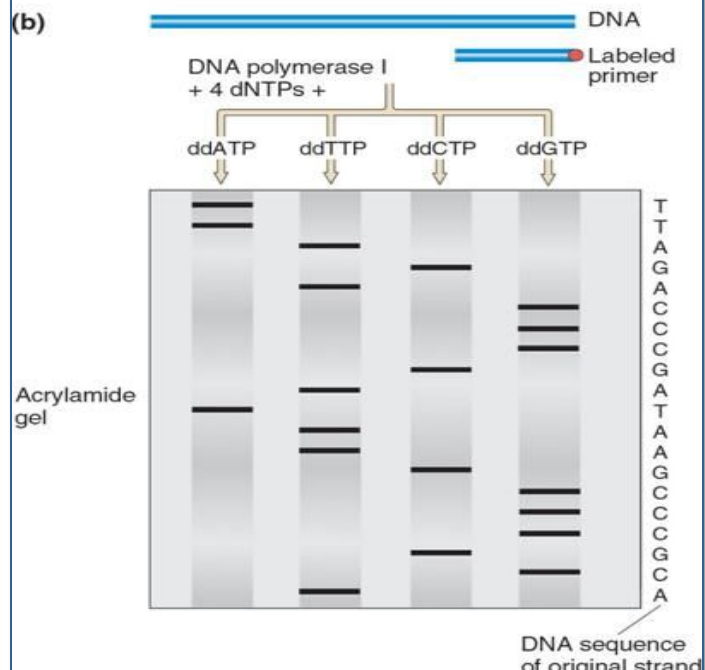
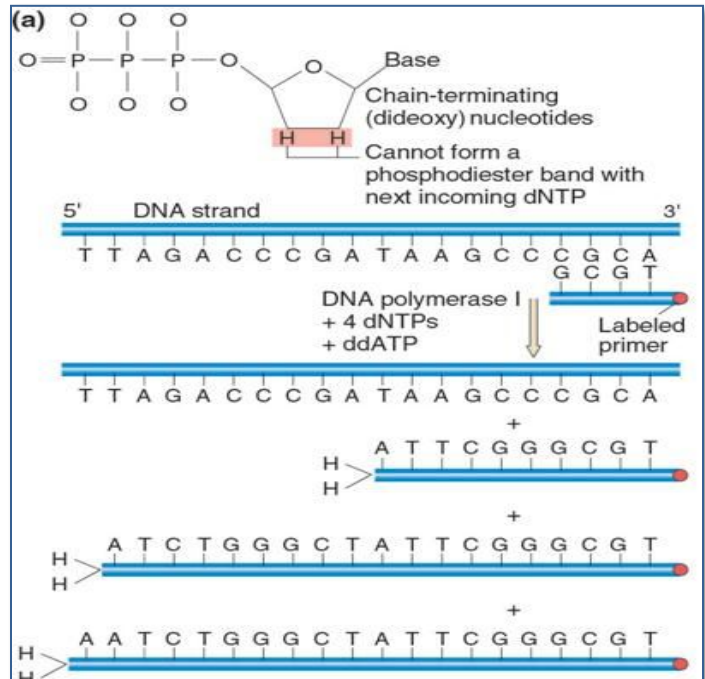
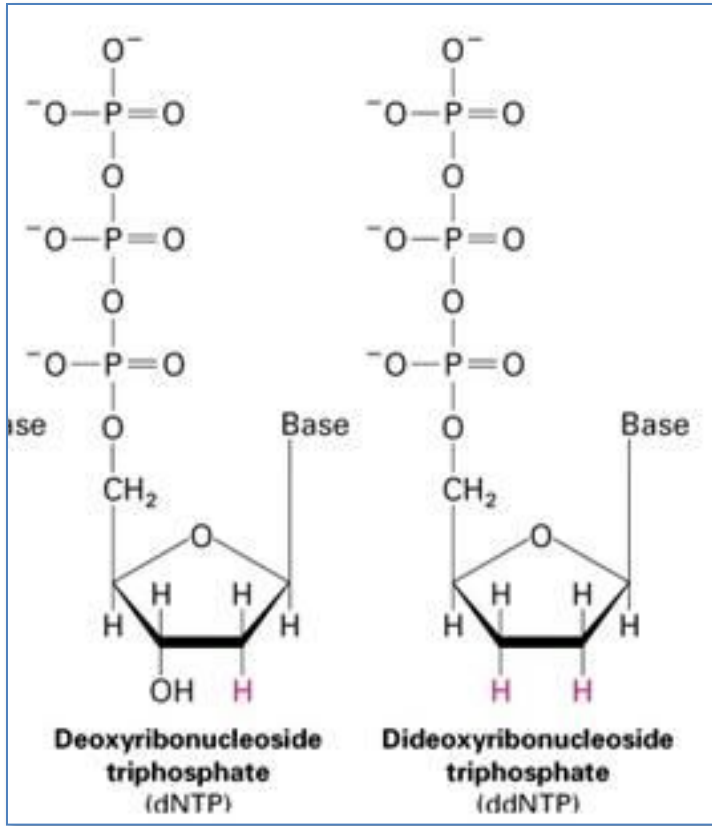


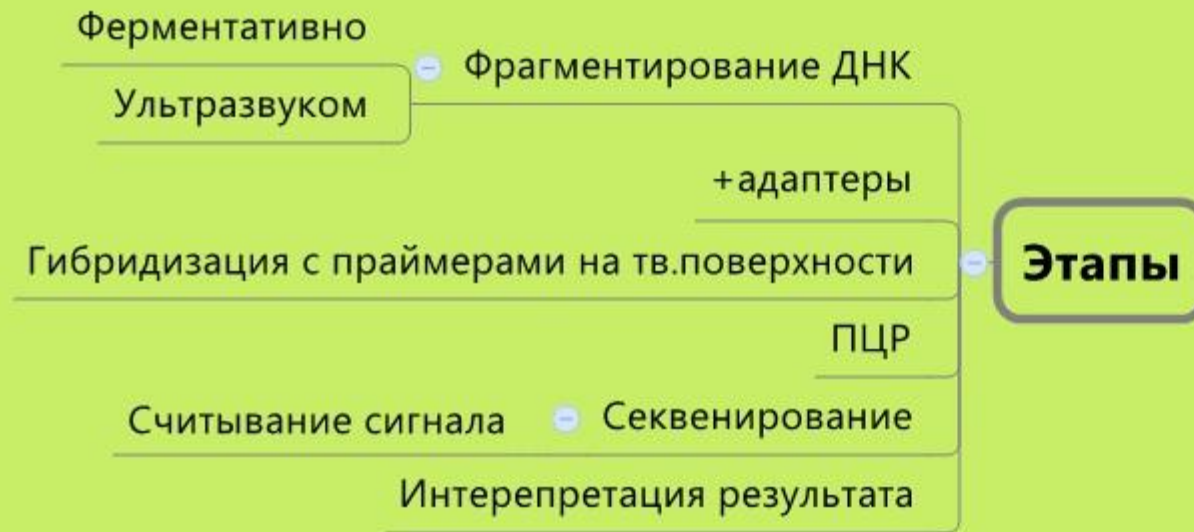
Метод «терминаторов»

4 пробирки: в каждой есть все 4 типа нуклеотидов и 1 тип терминирующих нуклеотидов в небольшом количестве (присоединившись к растущей цепи молекулы ДНК, они мешают присоединению последующих нуклеотидов). В пробирке, где находится терминирующий нуклеотид А, синтез каждой новой молекулы ДНК может оборваться в любом месте, где должна встать А, и т. д. На гель наносят 4 дорожки. Чтобы увидеть полосы, 1 нуклеотид (А, Т, G или С) метится радиоактивными изотопами. Короткие молекулы “убегают” вперед, а длинные остаются на старте. Таким образом можно определить последовательность нуклеотидов.

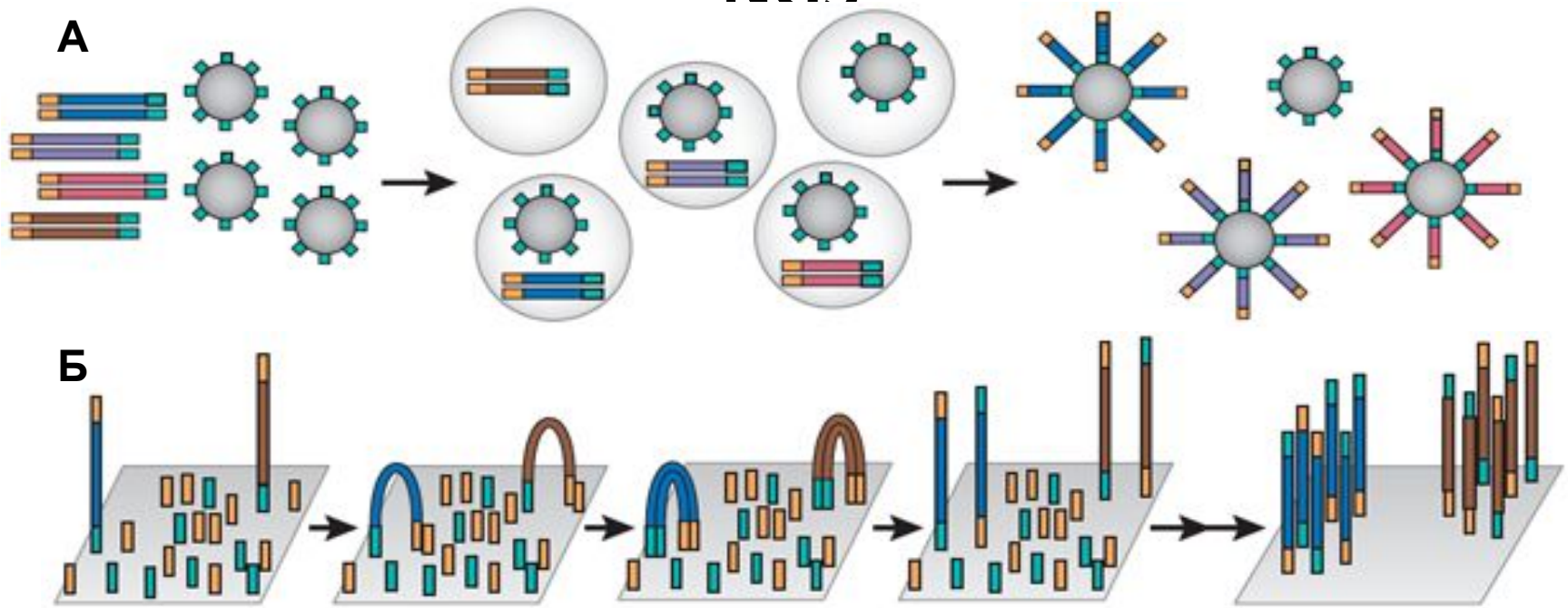




Основные этапы секвенирования



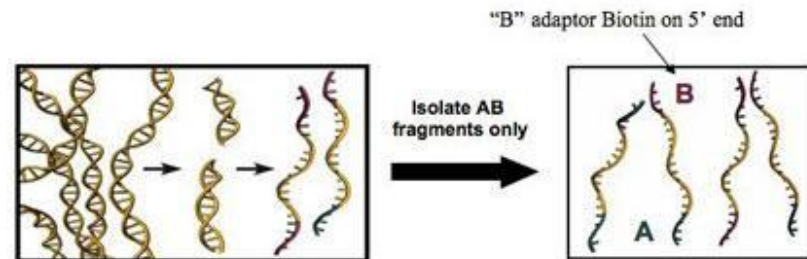
Клональная амплификация секвенируемых фрагментов в методах NGS



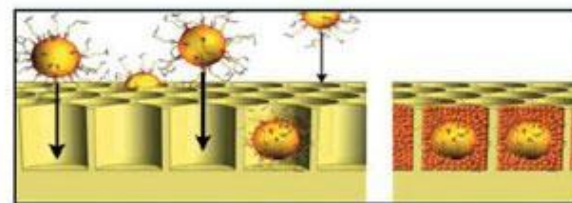
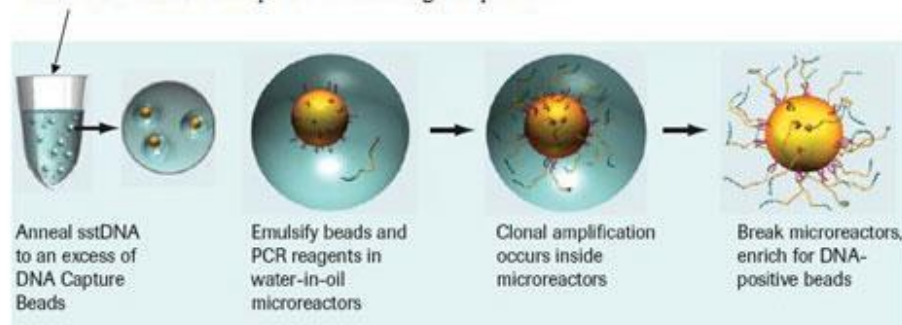
А – для платформ «GS FLX», «SOLiD» и «PGM» используется эмульсионная ПЦР на поверхности микрошариков. Каждый фрагмент ДНК с обоих концов имеет адаптеры. На поверхности каждой микросферы прикреплен один вид праймеров, которые комплементарны одному из адаптеров на концах фрагментов ДНК;

Б – технология «Solexa» использует кластерную ПЦР на подложке, поверхность которой покрывают праймеры двух типов, соединенные с ней через линкеры. Продукты амплификации, происходящие от любого одиночного фрагмента ДНК из библиотеки, остаются локально расположенными около места синтеза и снова амплифицируются по соседству.

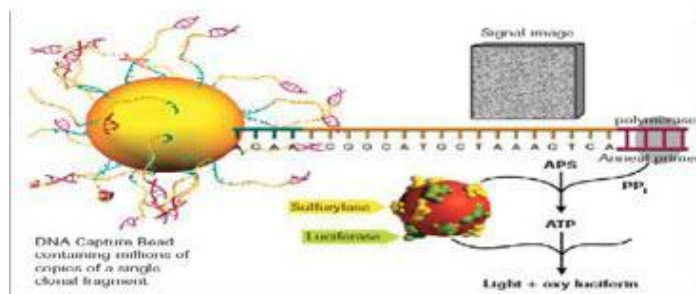
- 1. ДНК фрагментируется, к фрагментам пришиваются олигонуклеотиды-«адаптеры»; фрагменты ДНК разделяются на 2 комплементарные цепи.
- 2. к каждой бусинке прикрепляются по 1 одноцепочечной ДНК. Отдельные бусинки заключаются в капли реакционной смеси, окруженные маслом. В результате эмульсионной ПЦР количество молекул на бусинке многократно увеличивается.
- 3. эмульсия разбивается, и цепи ДНК-фрагментов, образовавшиеся в результате эПЦР, разделяются. Бусинки, несущие одноцепочечные копии фрагмента ДНК, помещаются по 1 в каждую лунку.



Products are bound to Streptavidin coated magnetic particles



- Well diameter: average of 44µm
- 200,000 reads obtained in parallel
- A single cloned amplified sstDNA bead is deposited per well

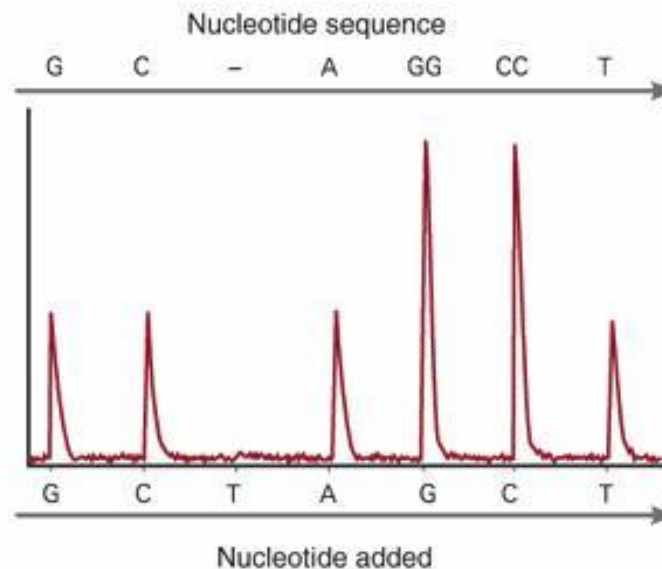
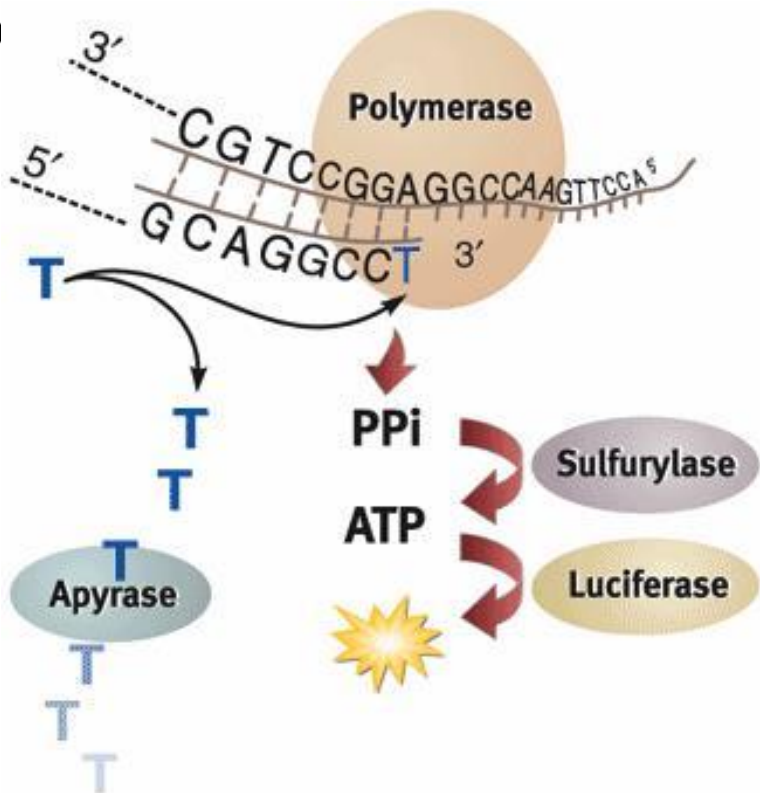


- 4 bases (TACG) cycled 52 times
- Chemiluminescent signal generation
- Signal processing to determine base sequence and quality score

Пиросеквенирование

Метод пиросеквенирования основан на определении пирофосфата, образующегося при синтезе комплементарной цепи ДНК. В 1988 г. Е.Нуман впервые предложил использовать этот метод для секвенирования. В 1996 г. Р.Nyrén и М.Ronaghi завершили детальную разработку данного метода.

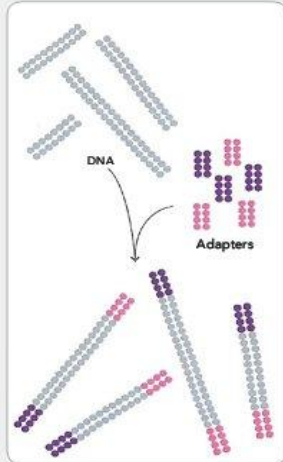
<http://>



Секвенирование на молекулярных кластерах с использованием флуоресцентно меченных предшественников.

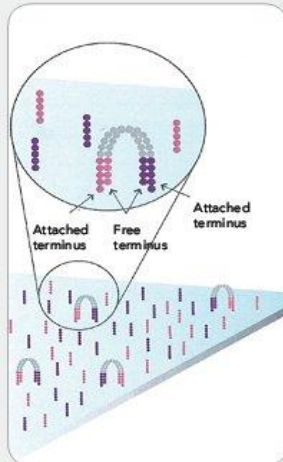
Illumina

1. PREPARE GENOMIC DNA SAMPLE



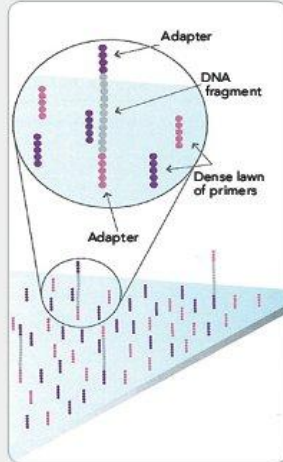
Randomly fragment genomic DNA and ligate adapters to both ends of the fragments.

4. FRAGMENTS BECOME DOUBLE STRANDED



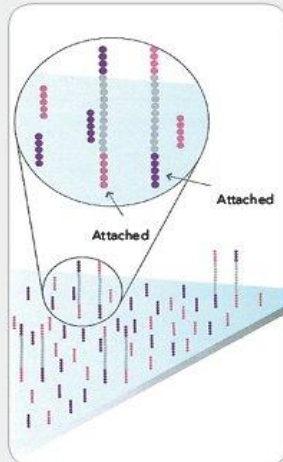
The enzyme incorporates nucleotides to build double-stranded bridges on the solid-phase substrate.

2. ATTACH DNA TO SURFACE



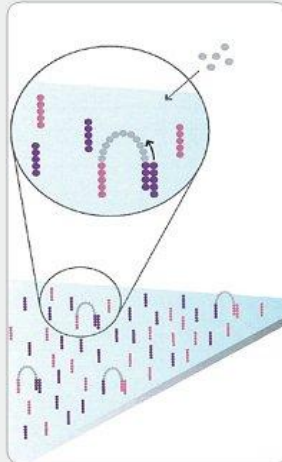
Bind single-stranded fragments randomly to the inside surface of the flow cell channels.

5. DENATURE THE DOUBLE-STRANDED MOLECULES



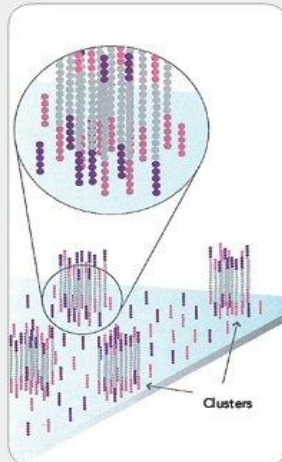
Denaturation leaves single-stranded templates anchored to the substrate.

3. BRIDGE AMPLIFICATION



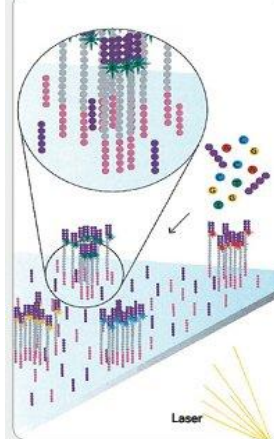
Add unlabeled nucleotides and enzyme to initiate solid-phase bridge amplification.

6. COMPLETE AMPLIFICATION



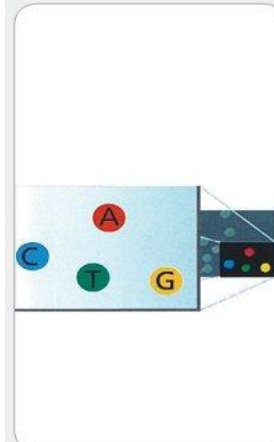
Several million dense clusters of double-stranded DNA are generated in each channel of the flow cell.

7. DETERMINE FIRST BASE



First chemistry cycle: to initiate the first sequencing cycle, add all four labeled reversible terminators, primers and DNA polymerase enzyme to the flow cell.

10. IMAGE SECOND CHEMISTRY CYCLE



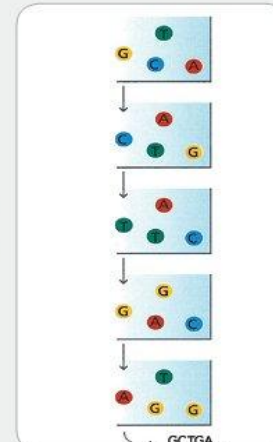
After laser excitation, collect the image data as before. Record the identity of the second base for each cluster.

8. IMAGE FIRST BASE



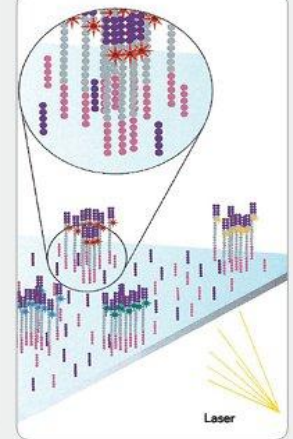
After laser excitation, capture the image of emitted fluorescence from each cluster on the flow cell. Record the identity of the first base for each cluster.

11. SEQUENCE READS OVER MULTIPLE CHEMISTRY CYCLES



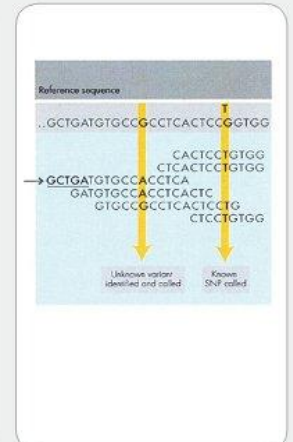
Repeat cycles of sequencing to determine the sequence of bases in a given fragment a single base at time.

9. DETERMINE SECOND BASE



Second chemistry cycle: to initiate the next sequencing cycle, add all four labeled reversible terminators and enzyme to the flow cell.

12. ALIGN DATA



Align data, compare to a reference, and identify sequence differences.

Секвенирование на молекулярных кластерах с использованием флуоресцентно меченных предшественников.

<http://www.youtube.com/watch?v=HMyCqWhwB8E>

Длина единичного фрагмента ДНК, секвенируемого данным методом, достигает 300 п.н. с точностью 99 %. Последняя выпущенная компанией «Illumina» система секвенирования – «HiSeq X» за один цикл способна секвенировать до 16 полных геномов человека с 30-кратным перекрытием (1600 млрд. п.н.) и консенсусной точностью до 99,999 %



Циклическое лигазное секвенирование.

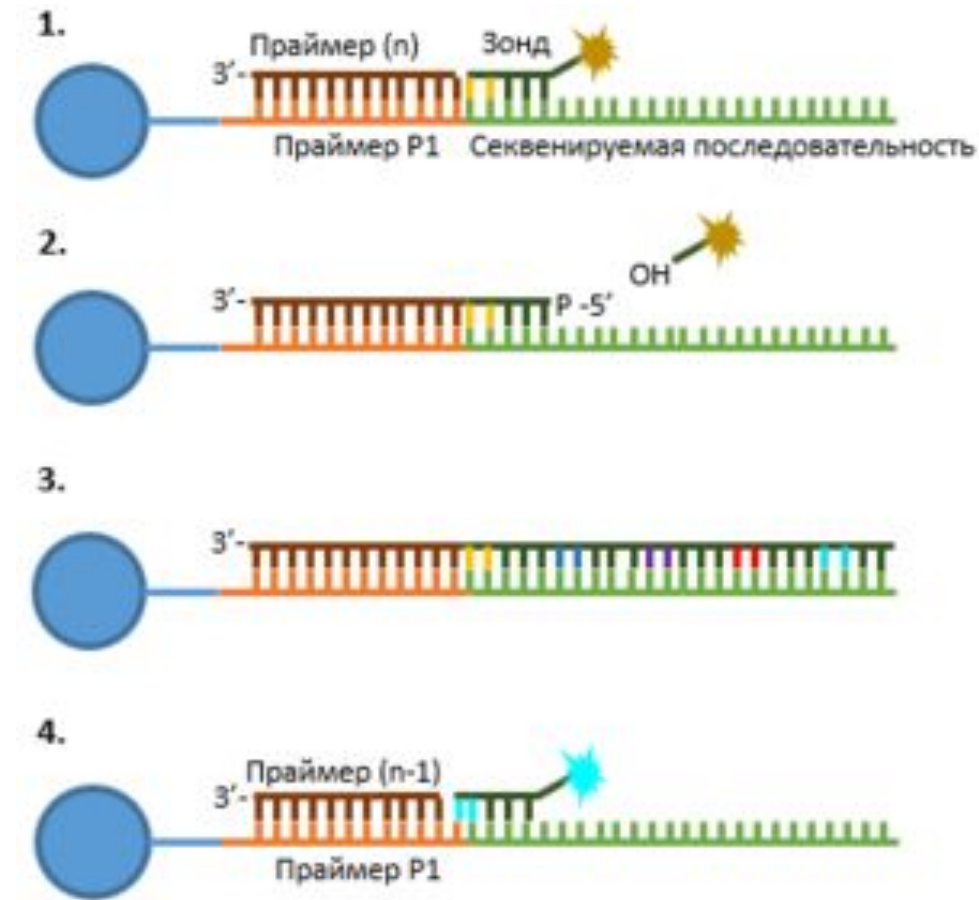
SOLiD

(1) Начало 1 раунда: добавление праймера длины n и 8ми нуклеотидного зонда, лигирование их друг с другом, детекция флуоресценции.

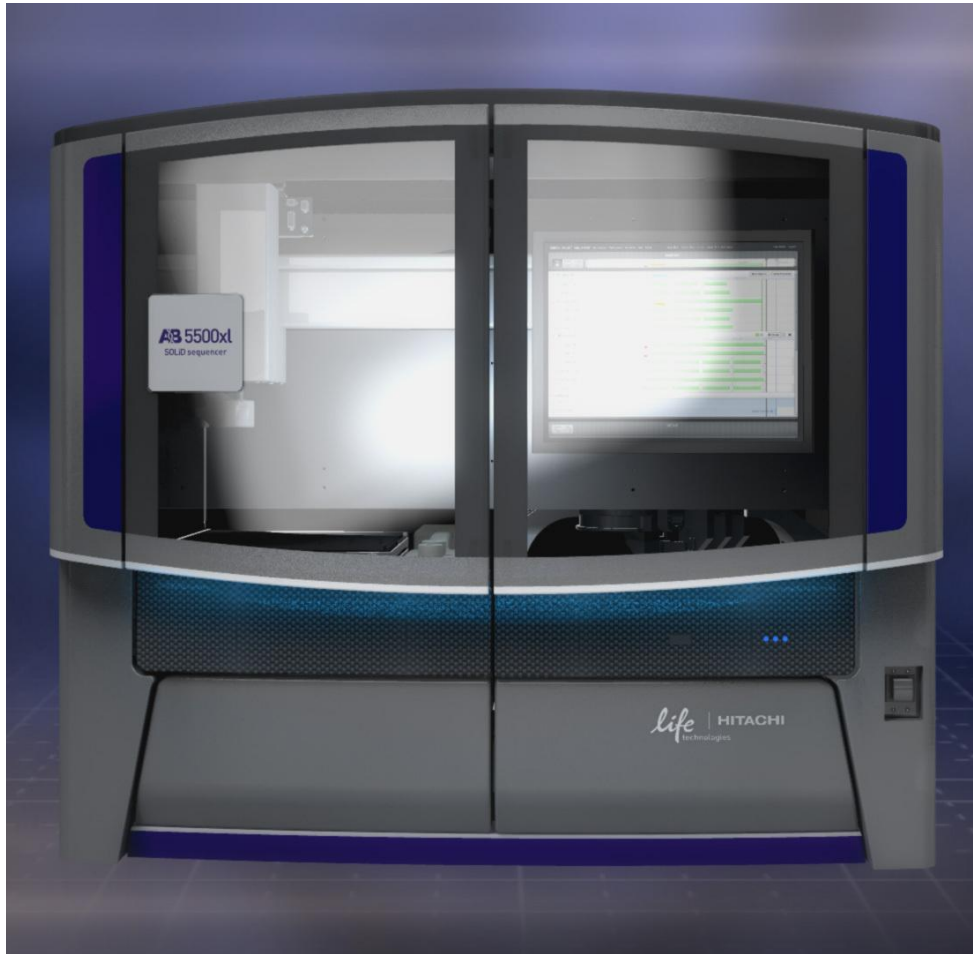
(2) Разрезание зонда, освобождение от метки.

(3) 5 последовательных циклов 1 раунда (повтор стадий (1) и (2)).

(4) Начало 2 раунда: добавление праймера длины $n-1$ и 8ми нуклеотидного зонда, лигирование их друг с другом, детекция флуоресценции.



Циклическое лигазное секвенирование.



Длина единичного фрагмента ДНК, секвенируемого методом лигирования, достигает 75 п.н. с точностью до 99,99 %. Выпущенный компанией «Applied Biosystems» прибор «5500xl SOLiD System» способен за один цикл секвенировать 3 полных генома человека с 30-кратным покрытием и точностью 99,9999 %

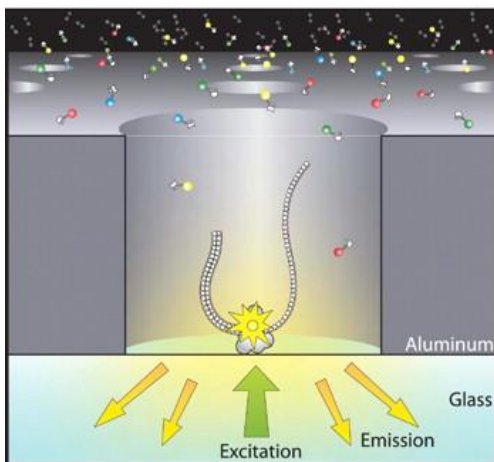
Сравнительная характеристика NGS и NNGS секвенаторов (январь 2014 г.)

Характеризуемый показатель	Модели секвенаторов							
	NGS							NGS
	GS Junior	FLX Ti+	MiSeq	HiSeq X	5500 xl	Ion Proton	PGM	PacBio RS
	Roche		Illumina		Life Technologies			Pacific Biosciences
Длина единичного «прочтения», п.н.	450	800	300	150	60	200	400	8500
Продолжительность этапа секвенирования, сут	0,42	0,42	0,3	3	7	0,17	0,3	0,1
Число секвенируемых нуклеотидов за цикл, млрд. п.н.	0,035	1	15	1600	180	10	2	6
Стоимость одного цикла (без приготовления библиотек), тыс. \$*	0,8	8	0,7	12	4	1,3	0,5	0,1

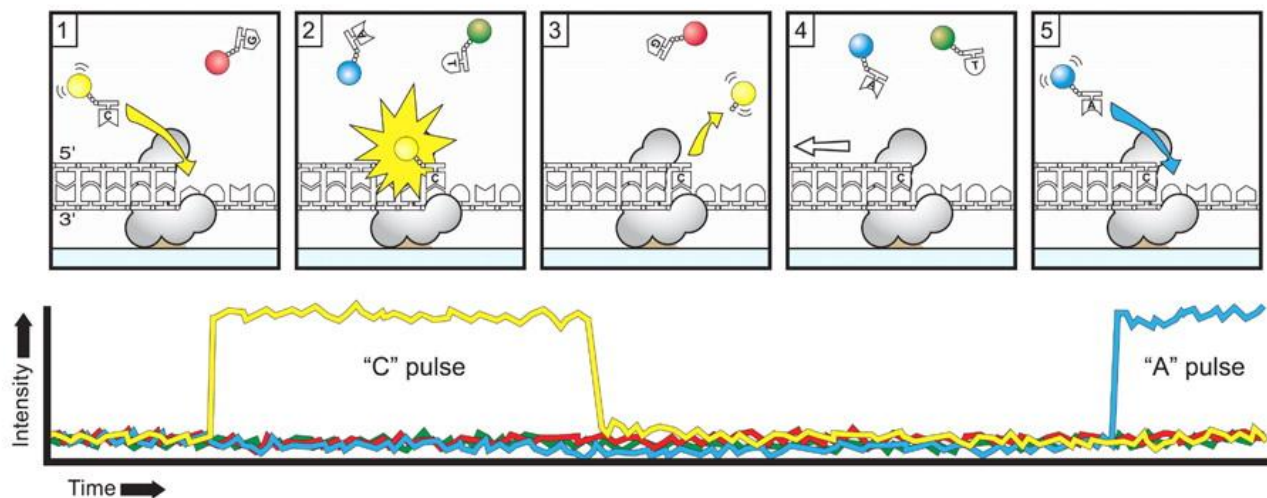
Секвенирование единичных молекул в реальном времени.

Секвенирование в реальном времени однонитевых фрагментов ДНК длиной до 10000 п.н. и более с помощью ДНК-полимеразы. На дно специальных ячеек, расположенных на прозрачном стекле, прикрепляются одиночные молекулы ДНК-полимеразы. Область вокруг закрепленного фермента просвечивается с помощью специального лазера. В каждую ячейку добавляют нуклеотиды всех четырех типов, помеченные разными светящимися маркерами. Область, которую анализирует лазер, столь мала, что меченые нуклеотиды не задерживаются в ней достаточно долго, чтобы их свечение было зафиксировано прибором. Если же ДНК-фрагмент удерживается полимеразой, то во время достройки его комплементарной цепи сигнал от каждого присоединившегося нуклеотида фиксируется в сканируемой

A



B



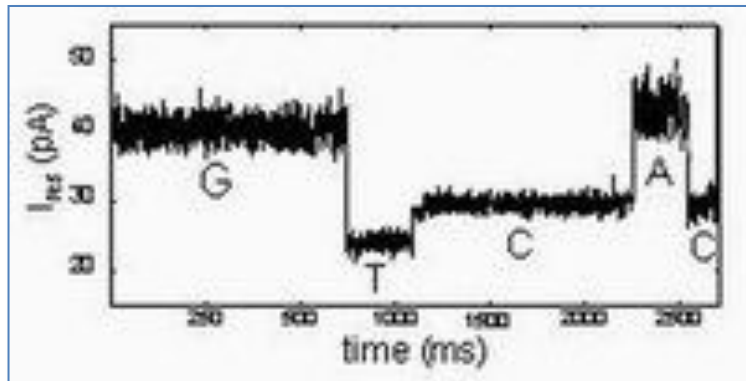
Секвенирование единичных молекул в реальном времени.



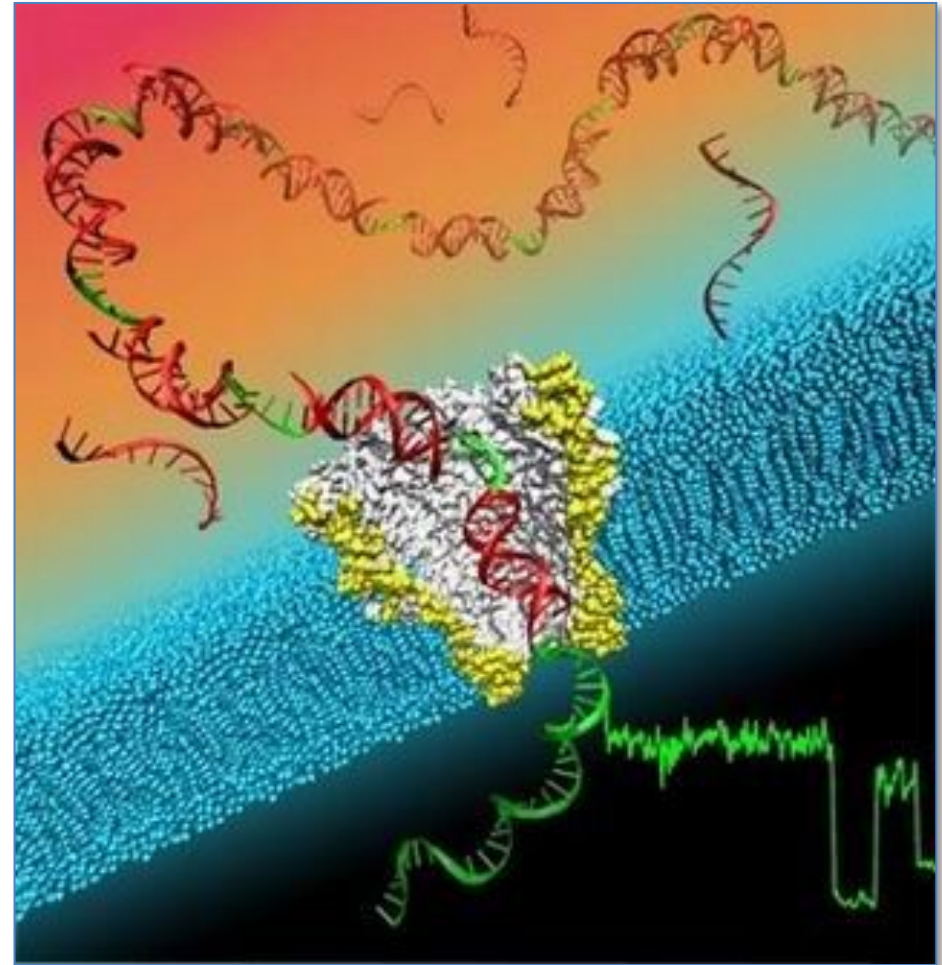
Прибор «PacBio RS», основанный на этой технологии, имеет высокую собственную стоимость, но в то же время экспрессную пробоподготовку, высокую скорость и низкую стоимость секвенирования ДНК

Нанопоровое секвенирование

Нанопору микобактерии поместили в мембрану, окруженную раствором KCl. Для создания текущего потока ионов прикладывается небольшое напряжение. Сигнатура электрического тока изменяется в зависимости от нуклеотида, проходящего через нанопору. Каждый из нуклеотидов ДНК - C, G, A и T – генерирует особую сигнатуру.



Электрические сигнатуры нуклеотидов ДНК при их прохождении через нанопору.



Одноцепочечная ДНК, проходящая через нанопору, используемую для ее секвенирования.