

Занятие №8. Секвенирование НК. Методы NGS.

Характеристика NGS

- **высокая производительность**
 - $\sim 10-10^2$ Gb
 - (десятки-сотни миллионов ридов)
- **малая длина ридов (прочтений)**
 - $< 1\text{kb}$ (1-3 сотни н.)
- **высокий уровень ошибок**

Покрытие

- Покрытие (глубина секвенирования) – важный параметр методов NGS: кратность прочтения каждого нуклеотида. Для каждой задачи необходимо своё покрытие (обычно устанавливают не менее, чем 30-тикратное покрытие).
- Таким образом, “эффективный” объём данных равен выходу секвенирования, делённому на покрытие.

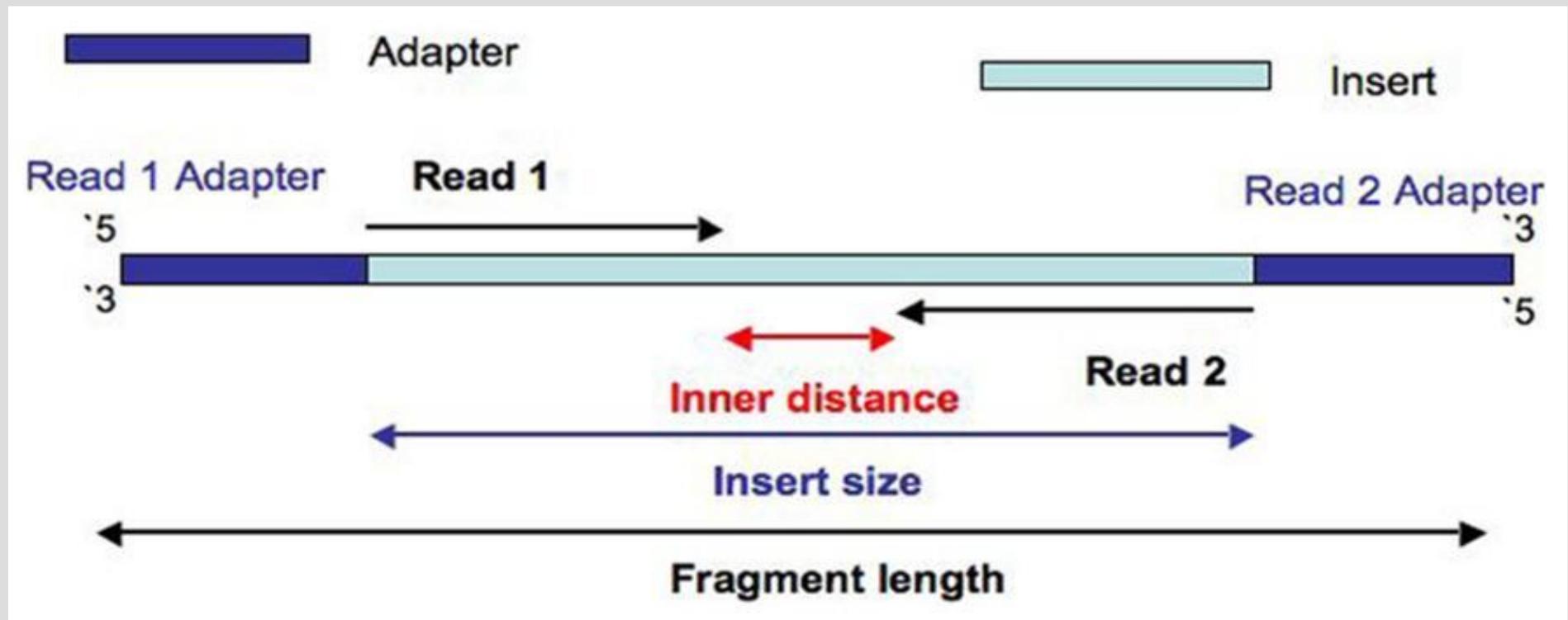
Этапы NGS

- 1. Создание ДНК-библиотеки
- случайная фрагментация молекул ДНК с получением фрагментов определённой длины
- лигирование адаптеров к концам фрагментов
- отбор фракции библиотеки с нужным размером фрагментов
- клональная амплификация библиотеки на твёрдой фазе (на микросферах или чипе секвенатора)
- 2. “Загрузка” секвенатора подготовленными библиотеками, проведение секвенирования
- 3. Биоинформатический анализ полученных данных (набор

Адаптеры

- Это “служебные” последовательности:
- содержат последовательность, комплементарную олигонуклеотиду, закреплённому на твёрдой фазе (чипа) рабочей поверхности секвенатора
- содержат последовательность, комплементарную праймерам
- могут содержать короткие фрагменты (баркоды), помечающие ДНК, полученную от разных организмов или источников (метагеном)

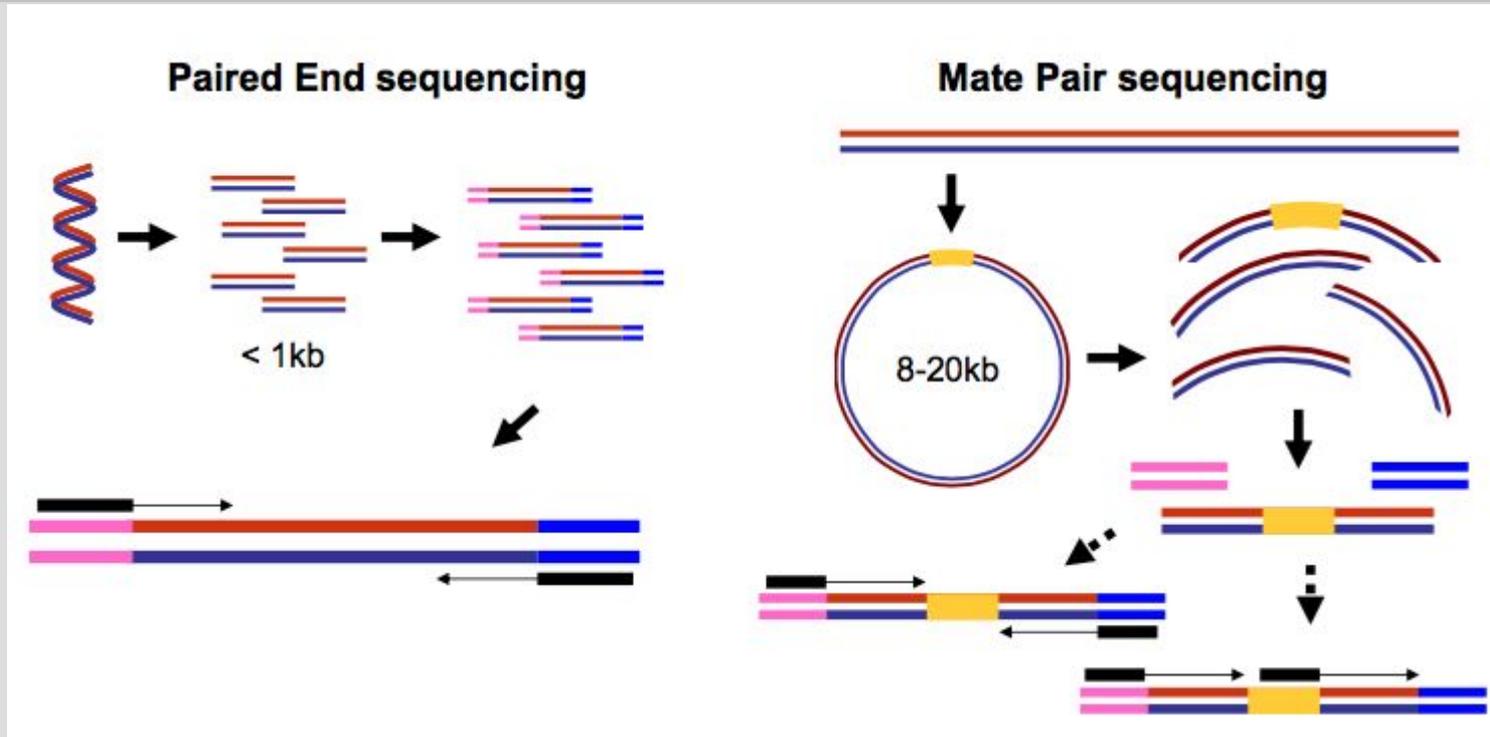
Структура фрагмента библиотеки



Фрагмент библиотеки состоит из адаптеров, ограничивающих информативный кусочек – вставку (insert).

Прочтение фрагментов может быть осуществлено только в одном направлении или в двух направлениях (секвенаторы Illumina и SOLiD)

Виды ДНК-библиотек для NGS: обычная (paired-end) и инвертированная (mate-pair)



Обычная библиотека фрагментов



Инвертированная библиотека фрагментов



Сборка с помощью ридов инвертированных библиотек

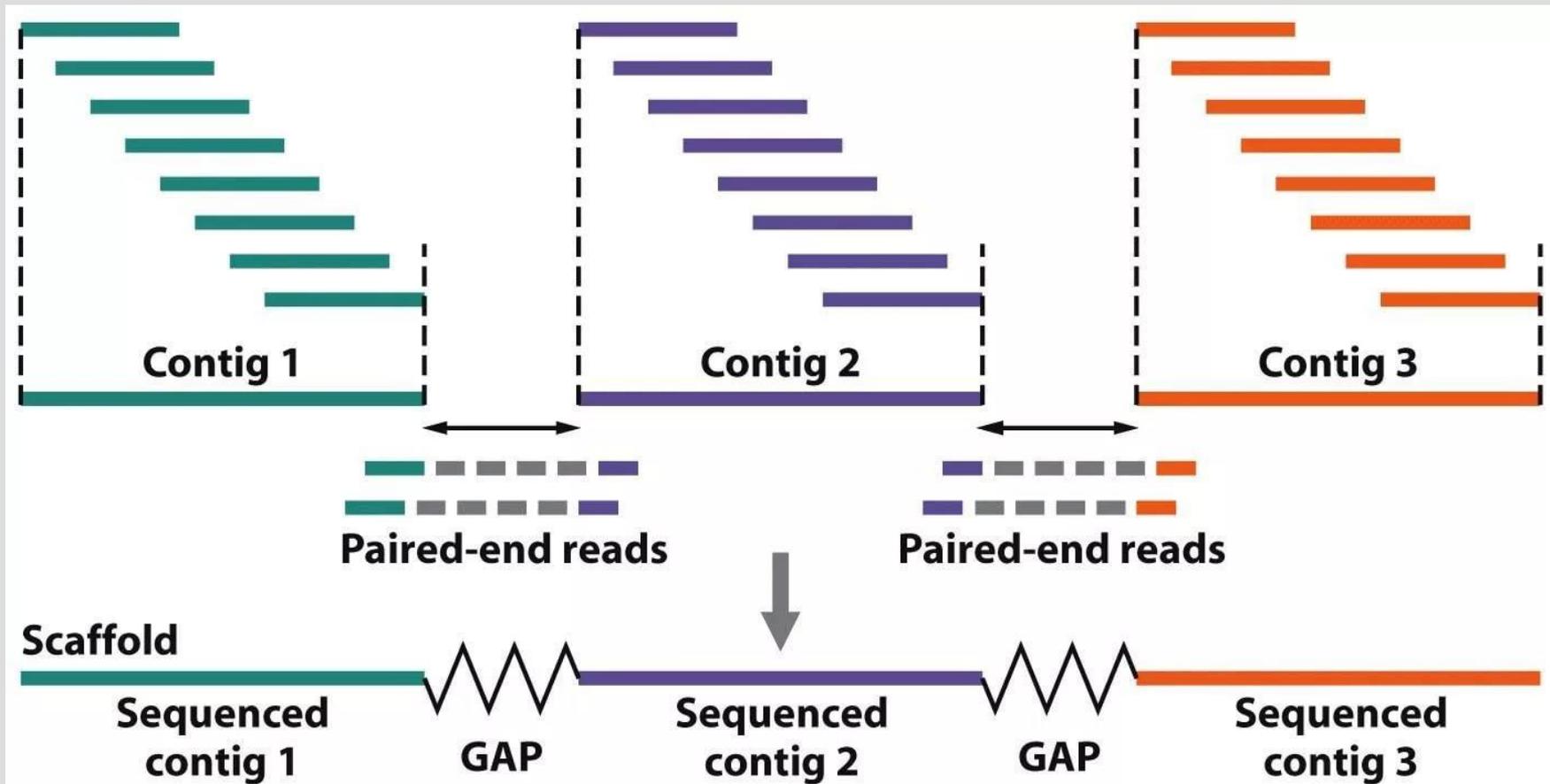


Figure 14-7
Introduction to Genetic Analysis, Tenth Edition
© 2012 W. H. Freeman and Company

Фрагментирование ДНК

1. Энзиматические способы:

- Эндонуклеазы и/или транспозазы

- “+”: малая трудозатратность

- пластичность протокола расщепления

- образование концов, подходящих для лигирования

- адаптеров

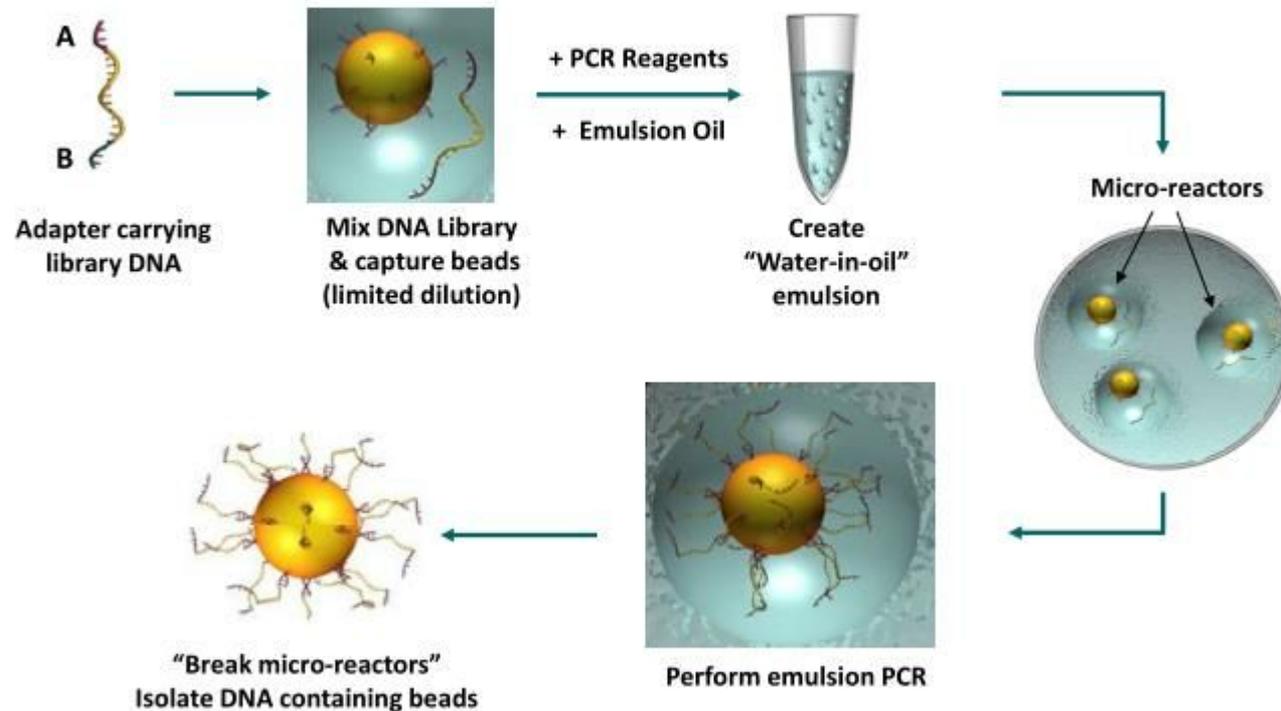
2. Физический способы:

- Сони́кация (ультразвуковое расщепление)

- Небулизация (пропускание через микроотверстие)

Клональная амплификация – эмульсионная ПЦР

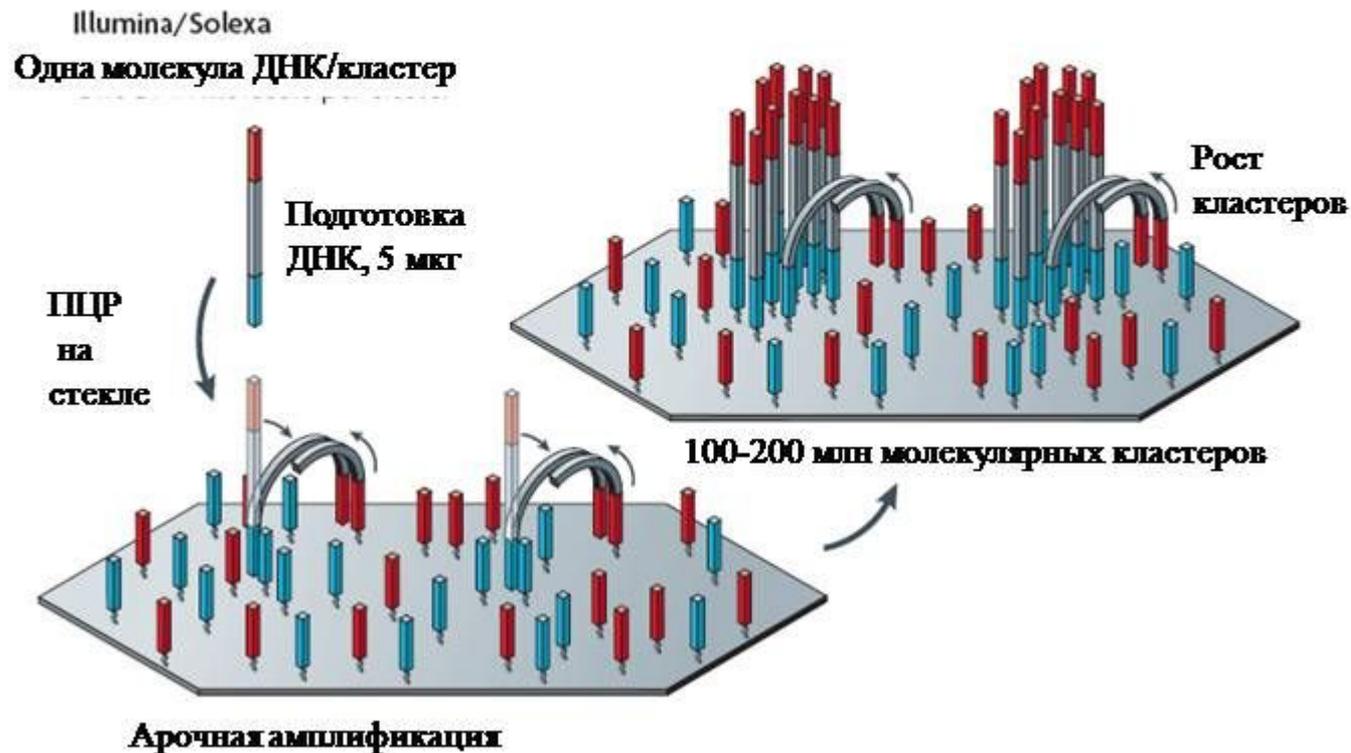
Emulsion Based Clonal Amplification



- Generation of millions of clonally amplified sequencing templates on each bead

Клональная амплификация – мостиковая ПЦР (секвенаторы Illumina)

Стратегии получения полимеразных колоний в секвенаторах второго поколения



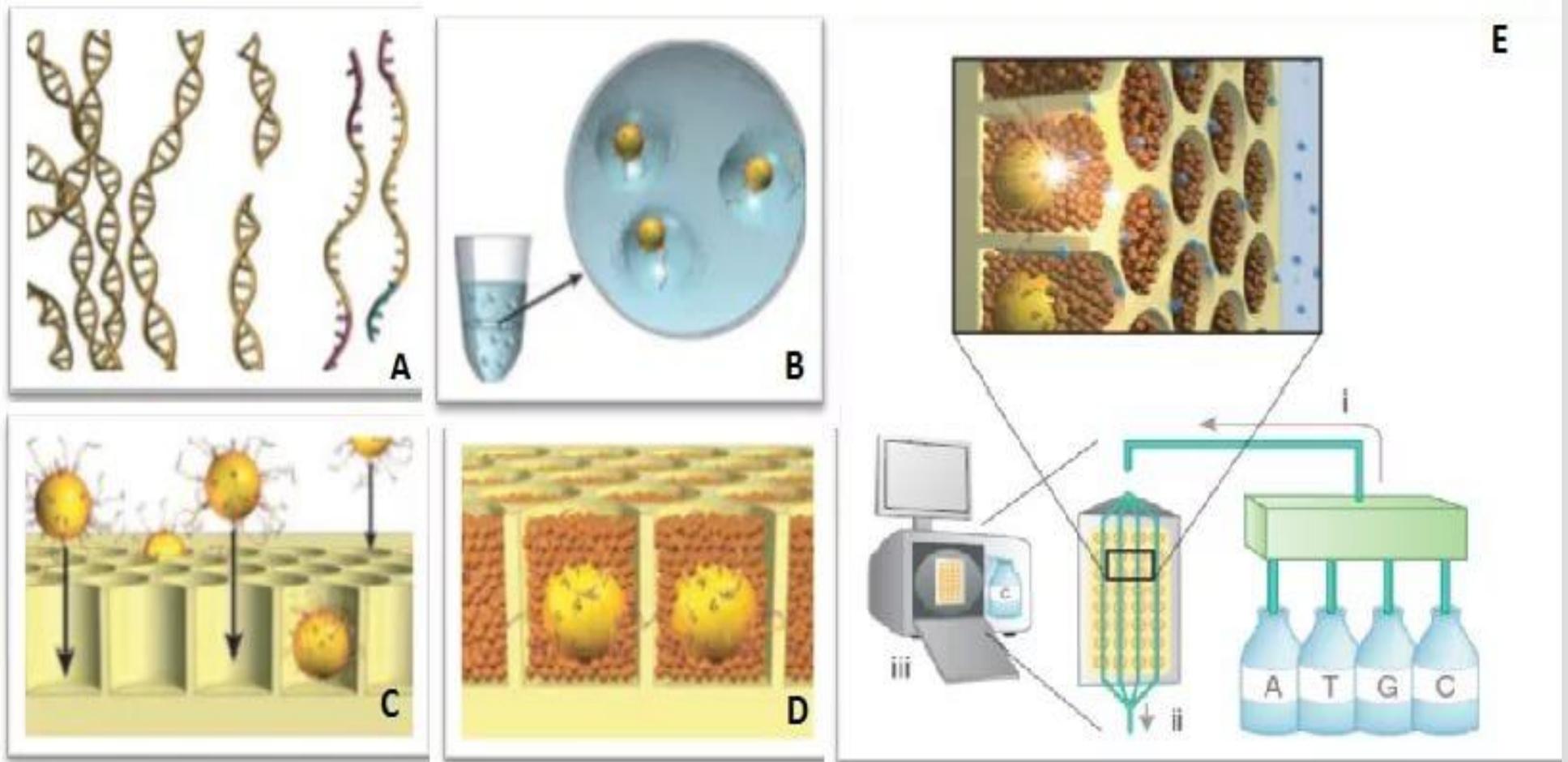
Существующие варианты секвенирования следующего поколения

- Методы секвенирования II поколения
 - – пиросеквенирование (**454 Life Sciences, Roche**)
 - – секвенирование с лигированием (SOLiD) (**Life Technologies Thermo Fisher Scientific**)
 - – полупроводниковое секвенирование (**Ion Torrent**)
 - – синтез с обратимым терминированием (**Illumina**)
- Методы секвенирования III поколения
 - – секвенирование с помощью нанопоры (**Oxford Nanopore**)
 - – обратимые терминирующие нуклеотиды для единичной

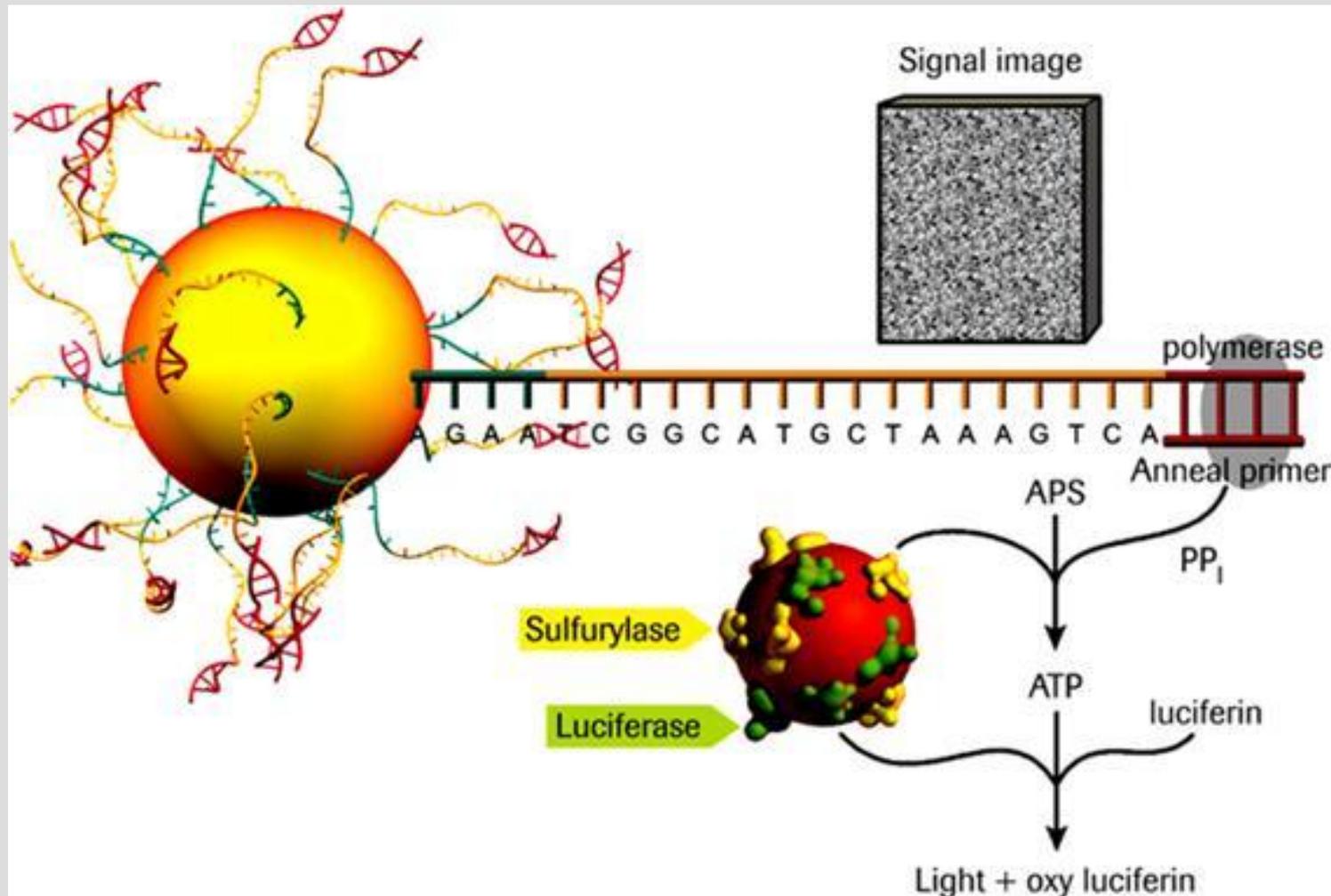
Принцип пиросеквенирования

В каждой ячейке чипа для секвенирования содержится микросфера с одинаковыми копиями фрагмента ДНК, а также полимераза, АТФ-сульфурилаза, люцифераза, аденозинсульфофосфат (APS) и люциферин. На каждом цикле в ячейки подаётся раствор, содержащий один тип дНТФ. В ходе полимеразной реакции комплементарный нуклеотид (или нуклеотиды) встраивается в цепь ДНК, а выделяющийся пирофосфат (PP) вступает в реакцию с APS с образованием АТФ, которая вызывает превращение люциферина в оксилуциферин с излучением света.

Пиросеквенирование: этапы



Пиросеквенирование: механизм

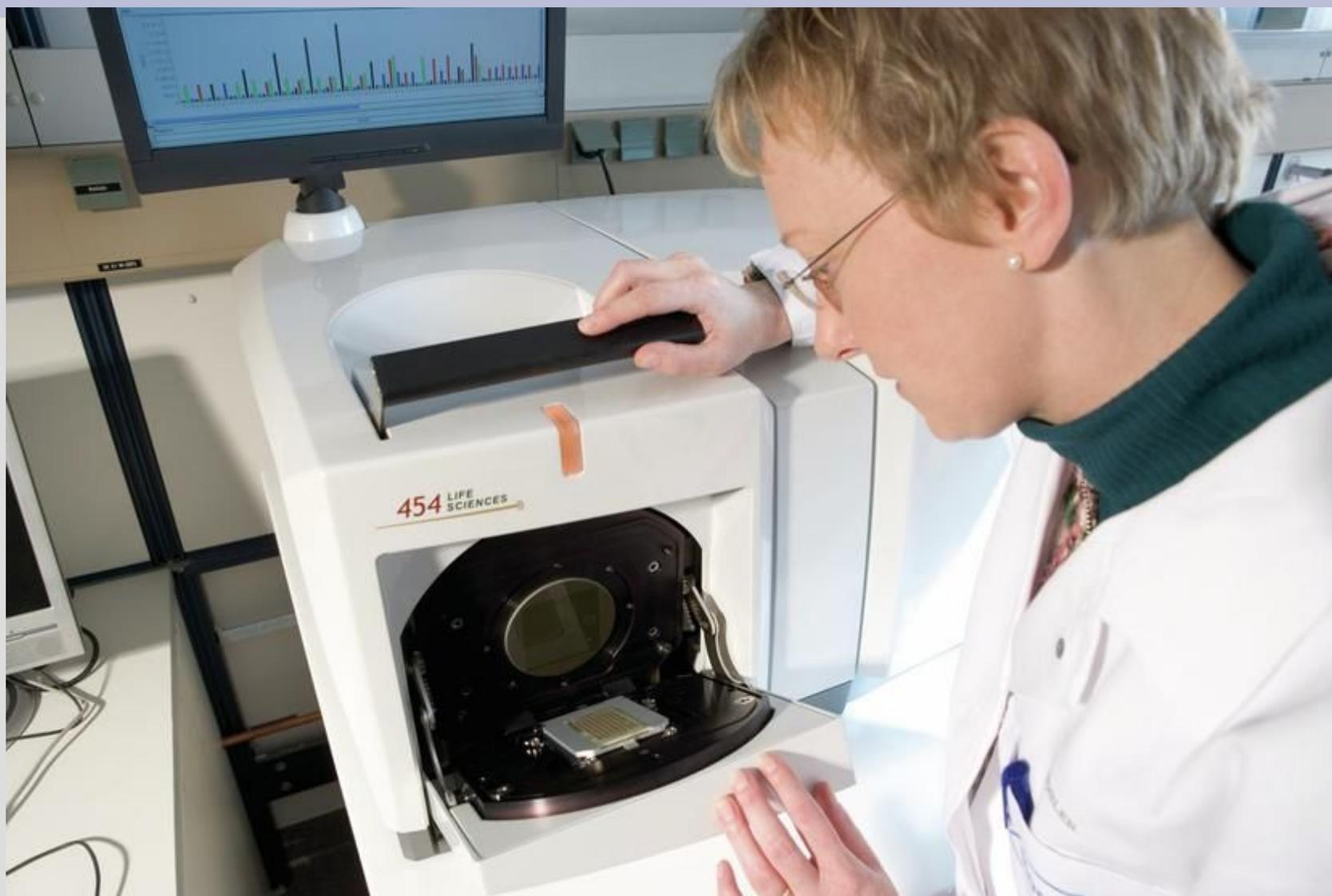


Пиросеквенаторы Roche

- Genome Sequencer Junior и Genome Sequencer FLX+



Матрица с микрореакторами пиросеквенатора FLX+



Характеристика пиросеквенирования (Roche)

Прибор	GS Junior	GS FLX
Длина прочтения		
Время запуска		
Стоимость		

Применение пиросеквенирования

- **Преимущества:**

- Большая длина ридов (сравнимо с “сэнгером”)
- Короткое время одного запуска
- Метод наименее чувствителен к GC-составу ДНК

- **Недостатки:**

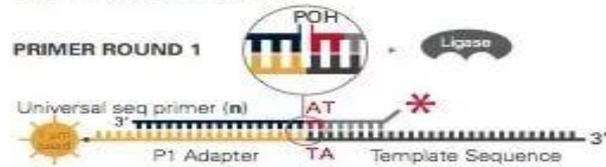
- Ошибки в прочтении гомополимерных участков (>8 н.)
- Высокая цена в пересчёте на производительность
- Поддержка пиросеквенаторов Roche 454 прекращена (с 2016 года)

Принцип секвенирования лигированием (SOLiD)

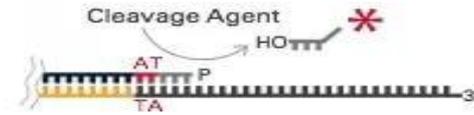
В ячейки твёрдой фазы, содержащие по одной микросфере с копиями фрагмента ДНК, добавляют праймер и 5' флюоресцентно-меченные октамеры, у которых известны только 2 нуклеотида с 3'-конца (всего 16 разных олигонуклеотидов). Проводят реакцию лигирования, в результате которой один из октамеров пришивается 3'-концом к праймеру, а 3 нуклеотида с 5'-конца вместе с меткой отщепляются – считывают флюоресцентный сигнал. После 10-15 лигирований синтезированную цепь удаляют и делают “перезагрузку”, добавляя олигонуклеотиды и праймер, идентичный изначальному, но короче на 1 нуклеотид. Так делают ещё 3 раза.

SOLiD

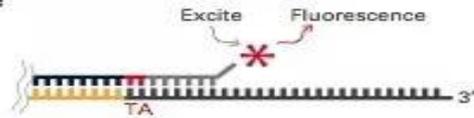
1. Prime and Ligate



4. Cleave off Fluor



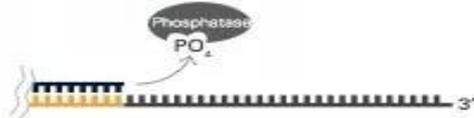
2. Image



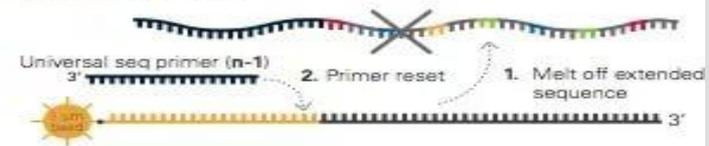
5. Repeat steps 1-4 to Extend Sequence



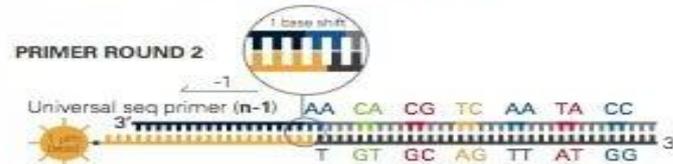
3. Cap Unextended Strands



6. Primer Reset



7. Repeat steps 1-5 with new primer



8. Repeat Reset with , n-2, n-3, n-4 primers

	Read Position	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35			
1	Universal seq primer (n) 3'																																							
2	Universal seq primer (n-1) 3'																																							
3	Universal seq primer (n-2) 3'																																							
4	Universal seq primer (n-3) 3'																																							
5	Universal seq primer (n-4) 3'																																							

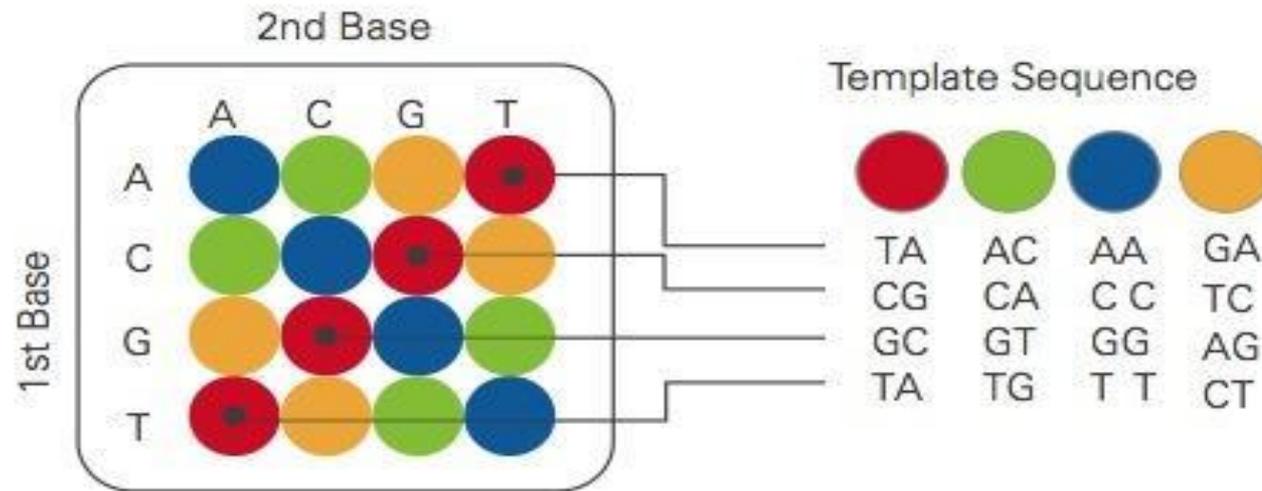
• Indicates positions of interrogation

Ligation Cycle ■ ■ ■ ■ ■ ■

SOLiD: цветное декодирование

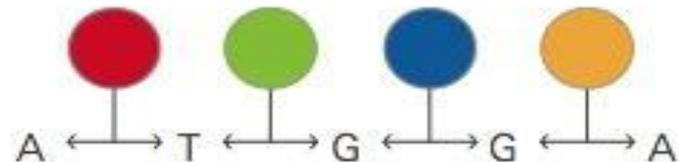
Для расшифровки нужно знать хотя бы один нуклеотид (праймер известен)

Possible Dinucleotides Encoded By Each Color



Double Interrogation

With 2 base encoding each base is defined twice



Секвенатор SOLiD 5500xl



Характеристика секвенирования с лигированием (SOLiD) (Applied Biosystems)

Прибор	SOLiD 5500
Длина прочтения	
Производительность	
Уровень ошибки	
Время запуска	
Стоимость	

Применение SOLiD

- **Преимущества:**
- Возможность осуществлять парные прочтения
- Каждая позиция прочитывается дважды (точность)
- Высокая производительность

- **Недостатки:**
- Короткие прочтения (75 н.)
- Сравнительно низкая скорость секвенирования
- Высокая стоимость секвенирования
- Малая надёжность (многоступенчатый процесс)

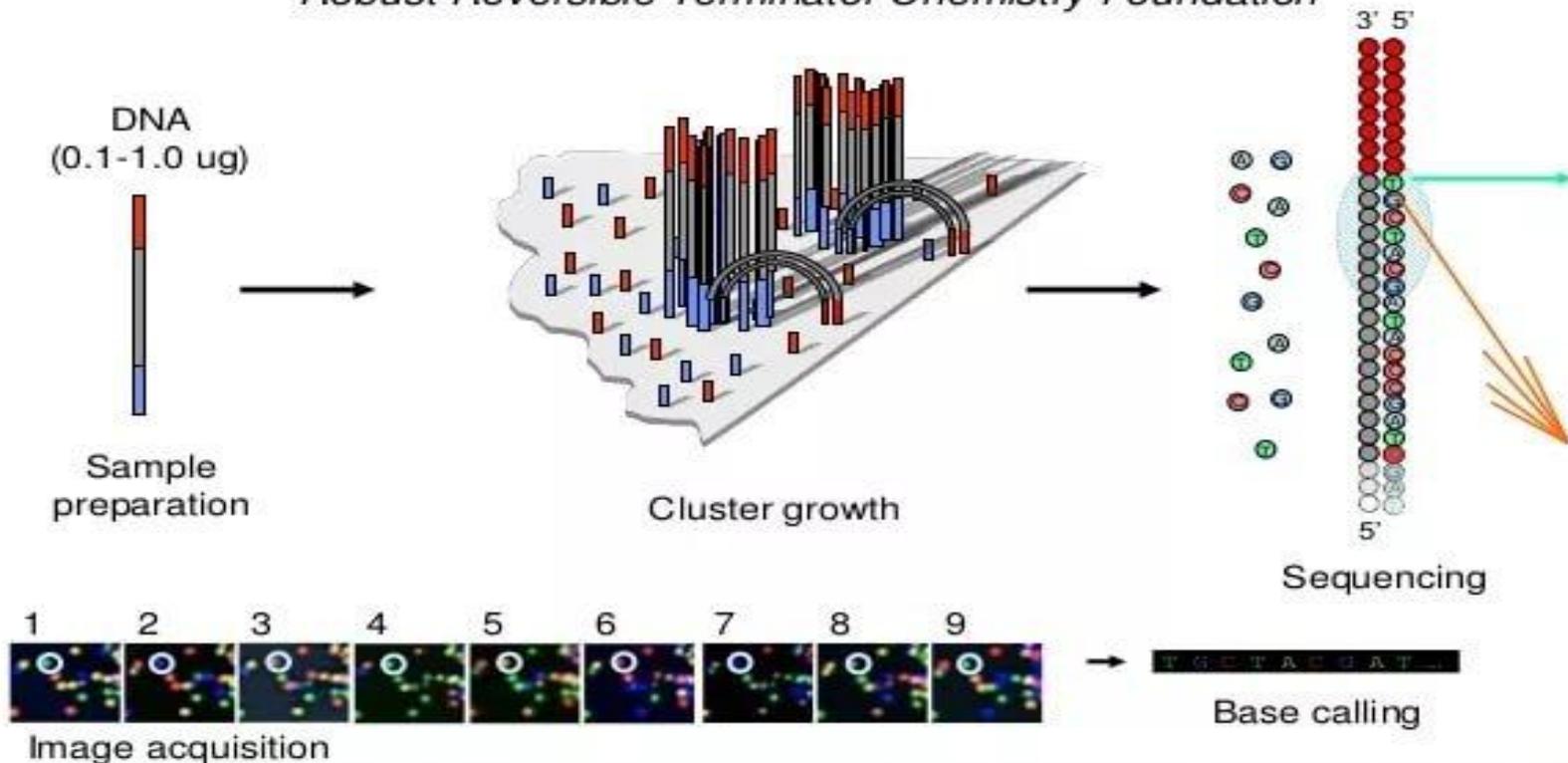
Принцип секвенирования с обратимым терминированием (Illumina)

- На чипе секвенатора проводят мостиковую ПЦР и осуществляют несколько циклов полимеразной реакции синтеза, в каждом из которых добавляют 4 типа флюоресцентно-меченных обратимых терминирующих дНТФ. Комплементарный дНТФ включается в новую цепь, высвобождая флюорофор, и терминирует дальнейший рост цепи. Сигнал детектируется, а блокировка с 3'-конца снимается ферментом. Цикл повторяется.

Синтез с обратимым терминированием (Illumina)

Illumina Sequencing Technology

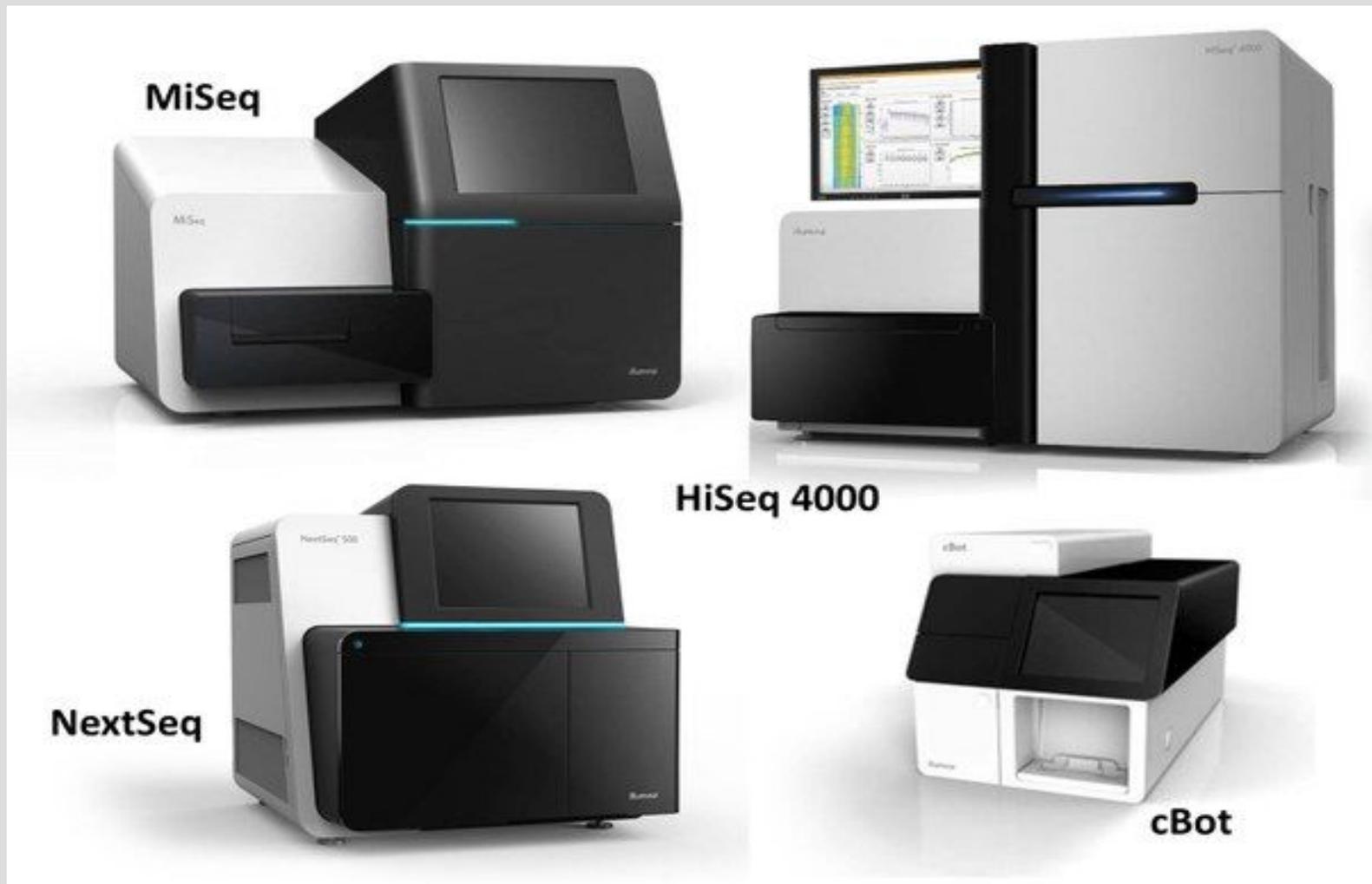
Robust Reversible Terminator Chemistry Foundation



Illumina MiSeq



Секвенаторы Illumina



Характеристика секвенирования с обратимым терминированием (Illumina)

Прибор	MiSeq	HiSeq 2500
	2 x	2 x
Производительность		
Уровень ошибки		
Время запуска		
Стоимость		

Применение Illumina

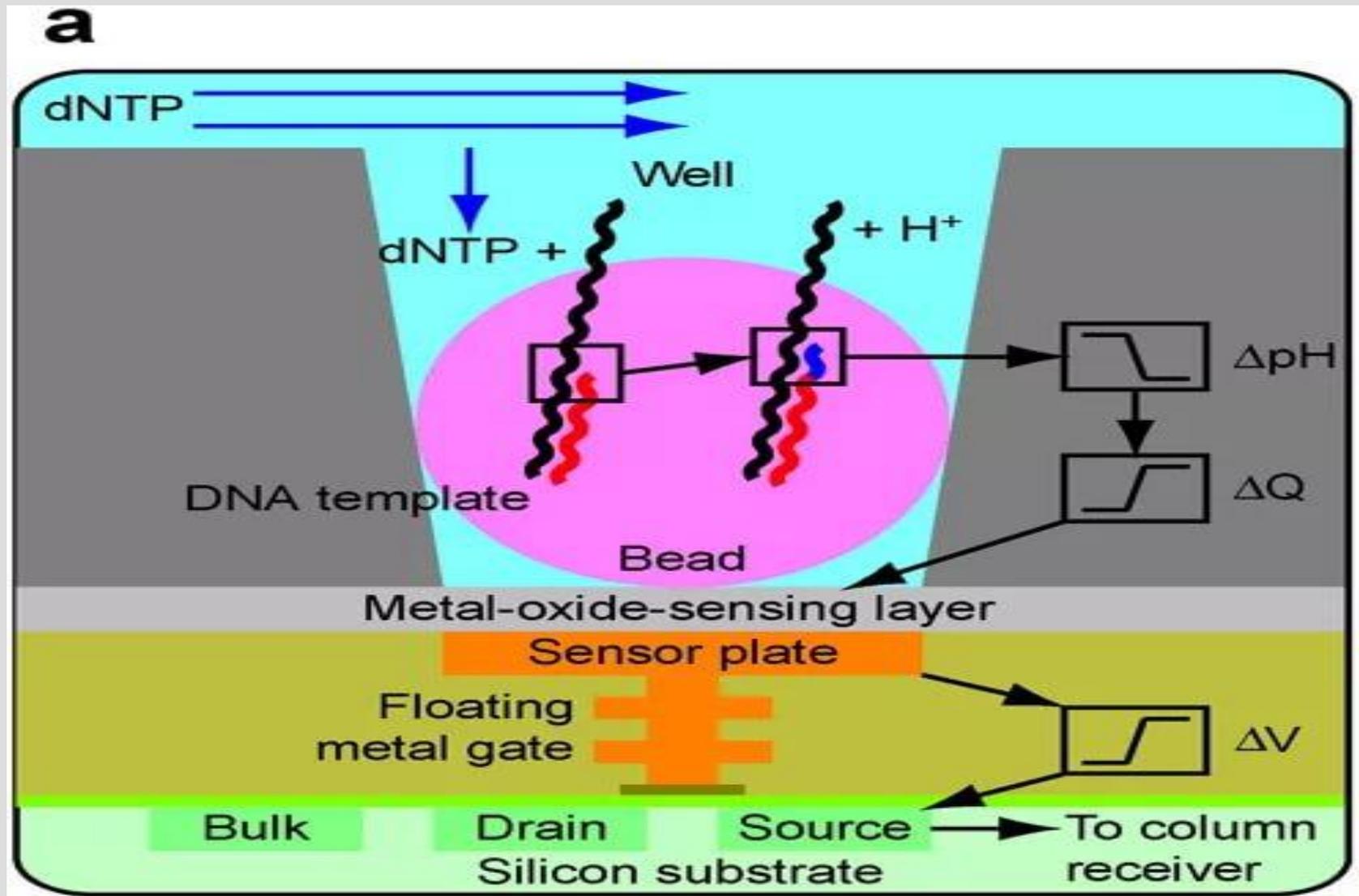
- **Преимущества:**
- Высокая точность прочтения (0,1%)
- Высочайшая производительность
- Возможность осуществлять парные прочтения
- Удобная пробоподготовка (нет необходимости в эмульсионной ПЦР)

- **Недостатки:**
- Дороговизна оборудования и реактивов
- Сравнительно низкая скорость секвенирования

Принцип полупроводникового секвенирования (IonTorrent)

- В микрореакторную ячейку, содержащую микросферу с фрагментом ДНК, циклически добавляют дНТФ одного типа. В результате включения одного или нескольких дНТФ в растущую цепь (ПЦР) происходит высвобождение иона водорода – рН уменьшается, что измеряется полупроводниковым рН-метром.

Ионно-полупроводниковое секвенирование



Секвенаторы IonTorrent: PGM и Proton



Характеристика ионно-полупроводникового секвенирования

Прибор	Ion PGM	Ion Proton
Длина прочтения		
Производительность		
Уровень ошибки		
Время запуска		
Стоимость		

Применение IonTorrent

- **Преимущества:**

- Сравнительно высокая скорость секвенирования
- Высокая производительность
- Длинные прочтения (до 400 bp)
- Низкая стоимость оборудования и расходных материалов
- Большой потенциал по увеличению производительности (увеличение количества ячеек не требует увеличения аппарата)

- **Недостатки:**

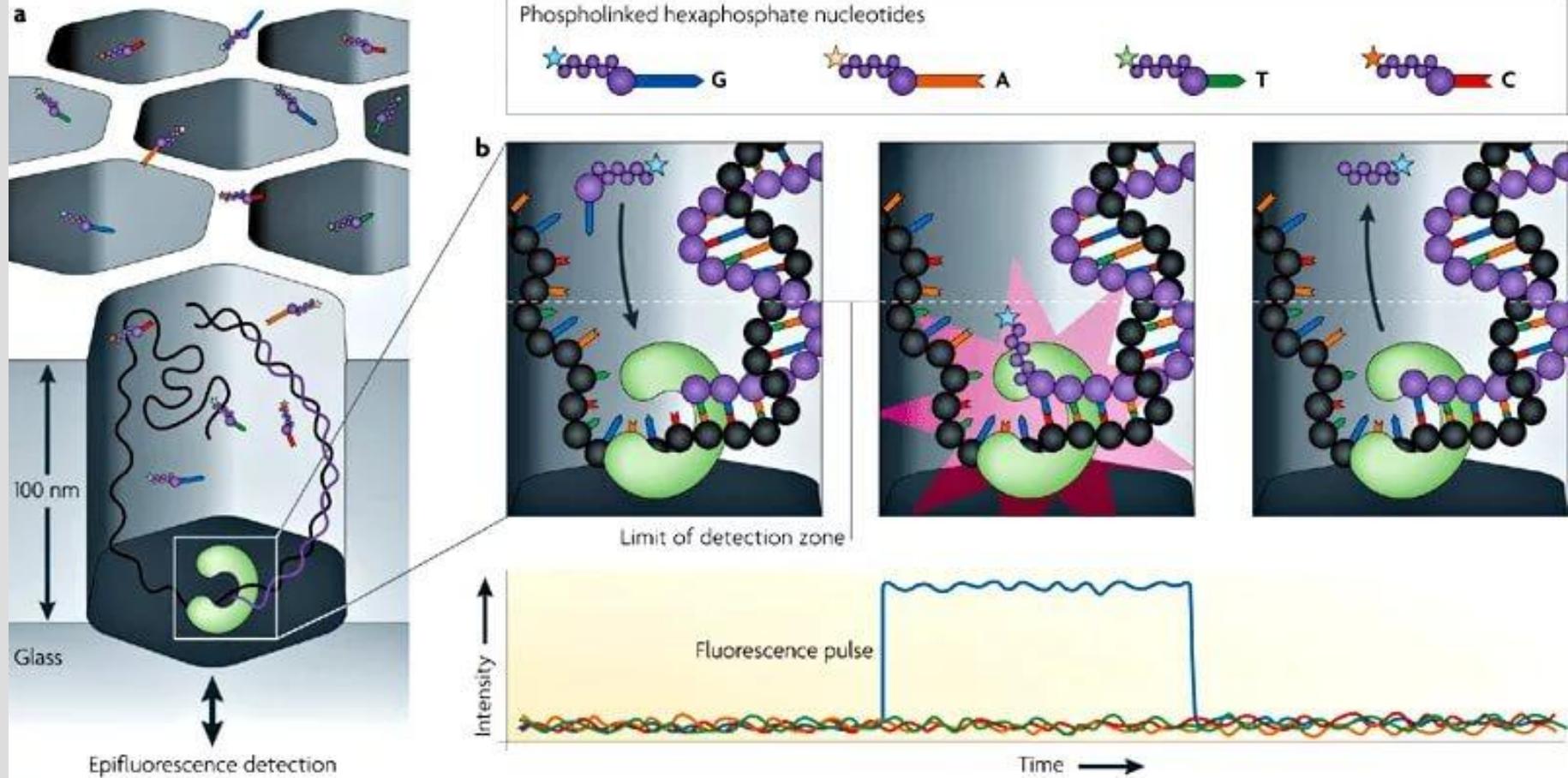
- Ошибки в прочтении гомополимерных участков
- Средняя точность (1%)
- Отсутствие парных прочтений
- Необходимость использования для реактивов воды высокого качества очистки (очиститель должен быть рядом с аппаратом)
- Необходимость баллона высокого давления с аргоном (для подачи реактивов)

Принципы методы секвенирования одной молекулы в реальном времени

- Принцип схож с методом, используемым в Illumina. Высокая разрешающая способность (детекция одного нуклеотида) достигается за счёт использования флюоресцентного ближнепольного микроскопа (апертура ~нм) (PacBio, HeliScope) или флюоресцентного конфокального микроскопа (Helicos Biosciences)

Одномолекулярное секвенирование в реальном времени (SMRT)

Pacific Biosciences — Real-time sequencing



Секвенатор PacBio RS



Характеристика SMRT (PacBio)

Длина прочтения	

Применение PacBio RS

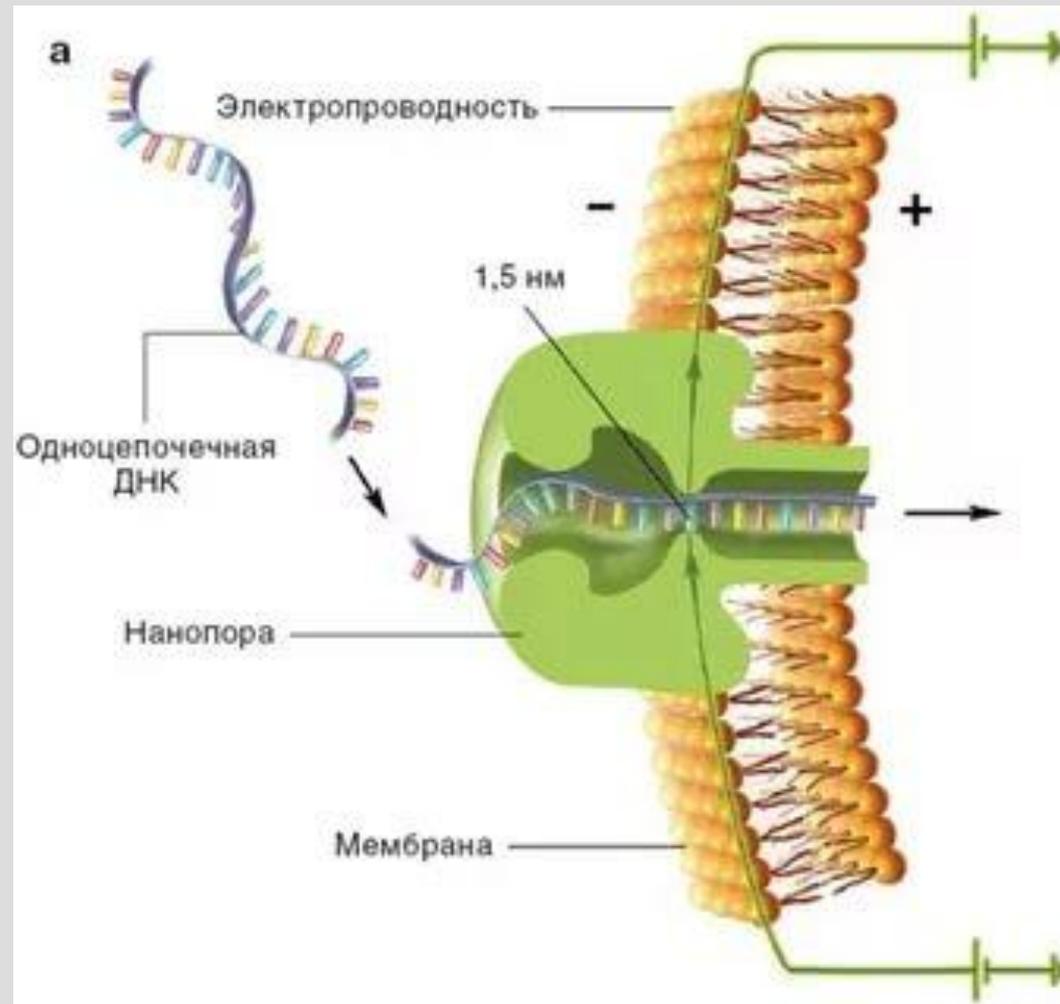
- **Преимущества:**
- Коммерческая доступность
- Высокая производительность
- Длинные прочтения (15 kb)

- **Недостатки:**
- Дороговизна приборов и реактивов
- Прибор занимает много места и массивен (> тонны)
- Невысокая точность (14%)

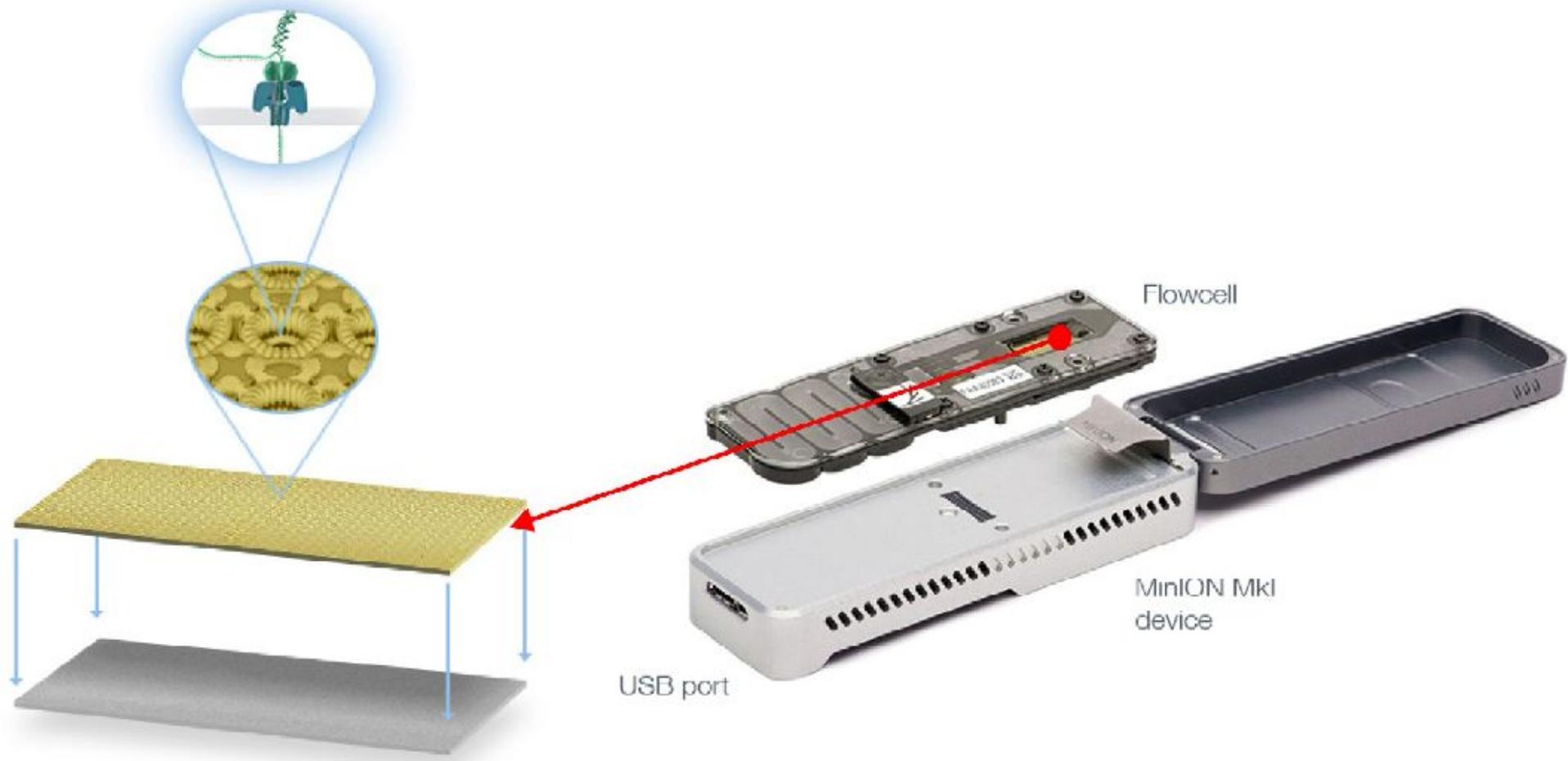
Принцип секвенирования с помощью нанопоры

- В реакционной микрокамере через нанопору в мембране пропущен постоянный ток. Движущаяся через пору молекула ДНК вызывает изменения в характеристиках тока, по величине и силе индивидуальные для каждого типа оснований

Секвенирование с помощью нанопоры



Секвенатор MinION (Oxford Nanopore)



Характеристика MinION (Oxford Nanopore)

Длина прочтения	

Применение Oxford Nanopore

- **Преимущества:**
- Очень простая пробоподготовка
- Миниатюрный прибор
- Устойчивость прибора к внешним воздействиям
- Очень длинные прочтения (до 200 kb)
- Дешевизна (1000\$)

- **Недостатки:**
- Высокий уровень ошибки

Астронавт Кейт Рубинс на МКС в 2016 году

