

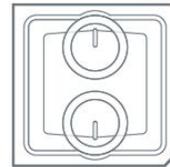
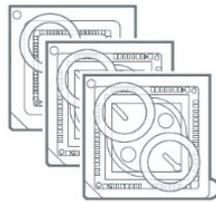
Секвенирование

- Ion Chip. Технология CMOS и устройство чипа для секвенирования.
- Подготовка образца и чипа к секвенированию, создание плана запуска прибора, получение данных.
- Personal Genome Machine™ (Ion PGM™). Характеристики прибора. Варианты чипов.
- Ion Proton™. Характеристики прибора. Чип P1 и его возможности.

«Агентство Химэксперт»

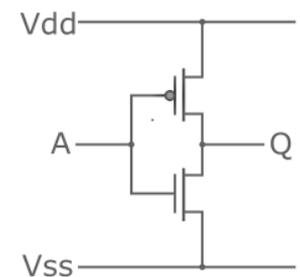
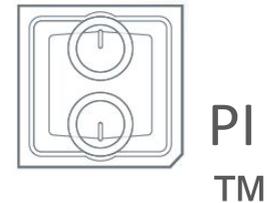
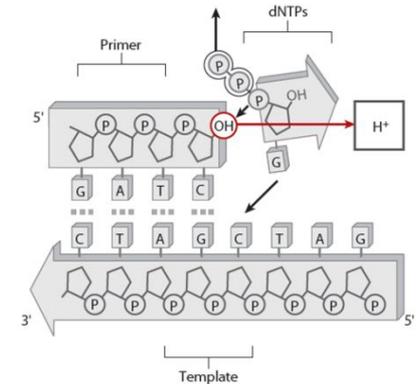


Ion Chip



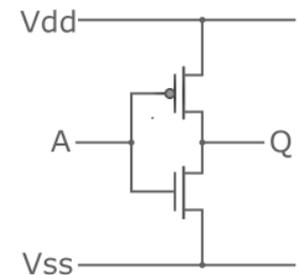
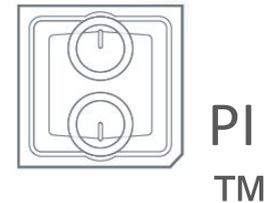
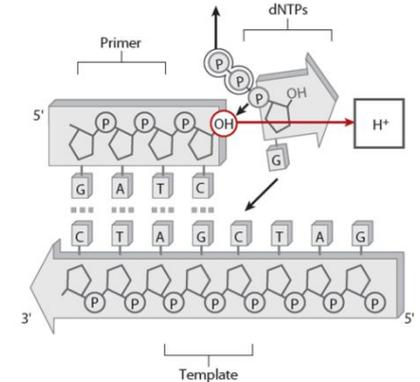
Технология

- Идея: секвенирование синтезом с электрохимической детекцией синтеза
- Каждая реакция имеет свой сенсор
- Всё организовано на чипе с большим количеством параллельно расположенных сенсоров
- В основе чипе технология построения электронных схем CMOS (complementary metal-oxide-semiconductor)



Технология

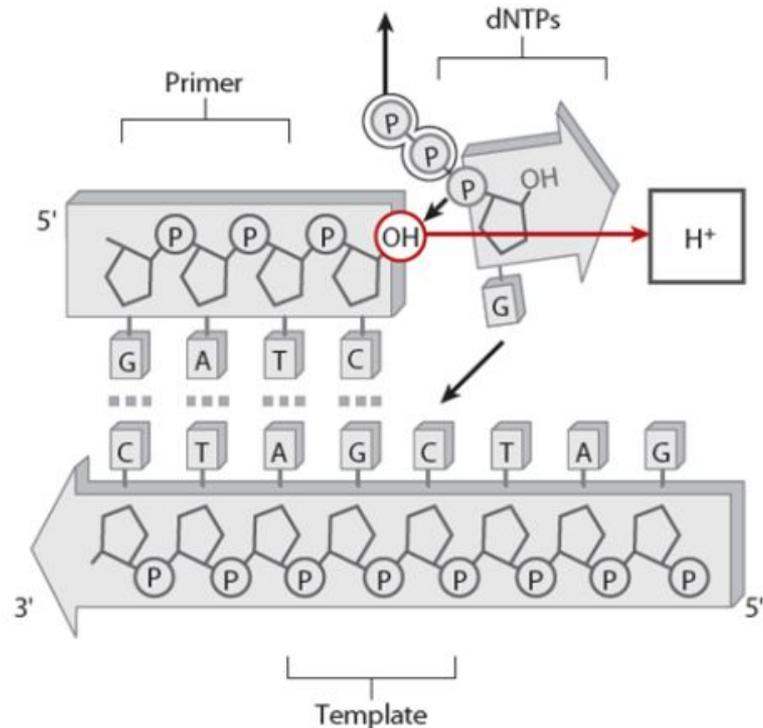
- **CMOS** – КМОП, комплементарная структура металл-оксид-полупроводник
- Подавляющее большинство современных логических микросхем, в том числе, **процессоров**, используют схемотехнику КМОП
- Микросхемы КМОП известны с 60-х г.г.
- Микросхемы КМОП стоят в электронных часах и калькуляторах.



Технология

- Полупроводниковое секвенирование —

регистрация локального изменения рН на полупроводниковом микрочипе при последовательном удлинении олигонуклеотидной затравки ДНК-полимеразой

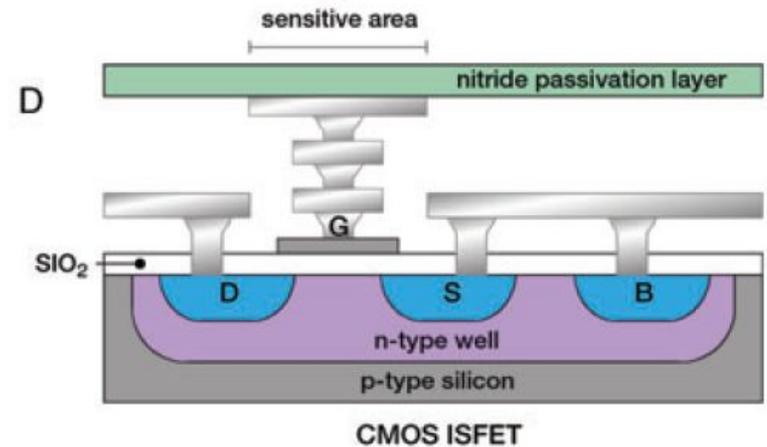
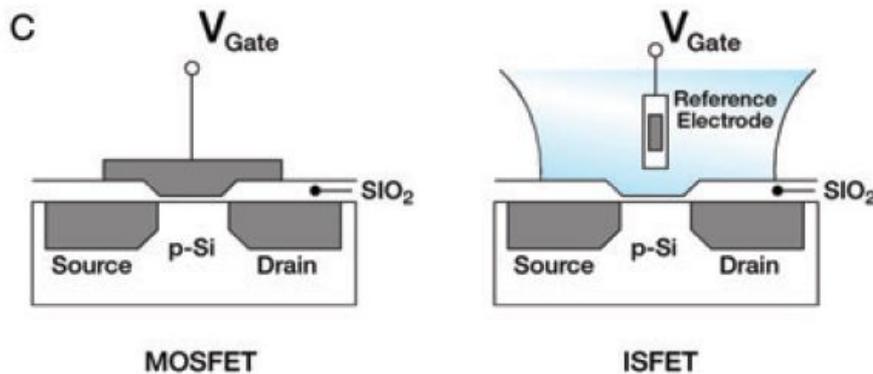
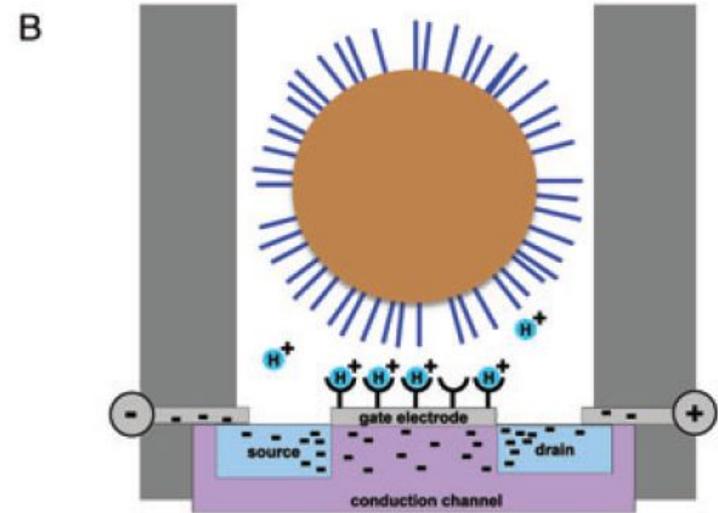
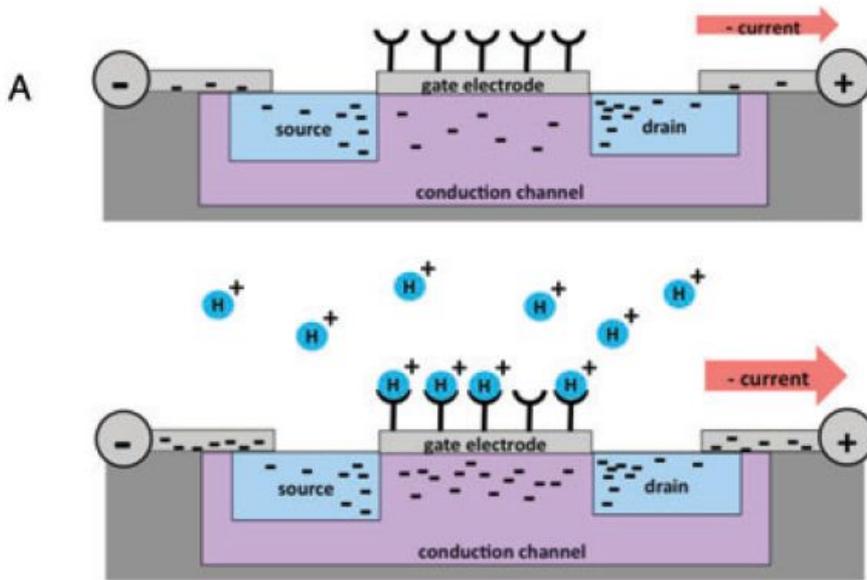


ion torrent

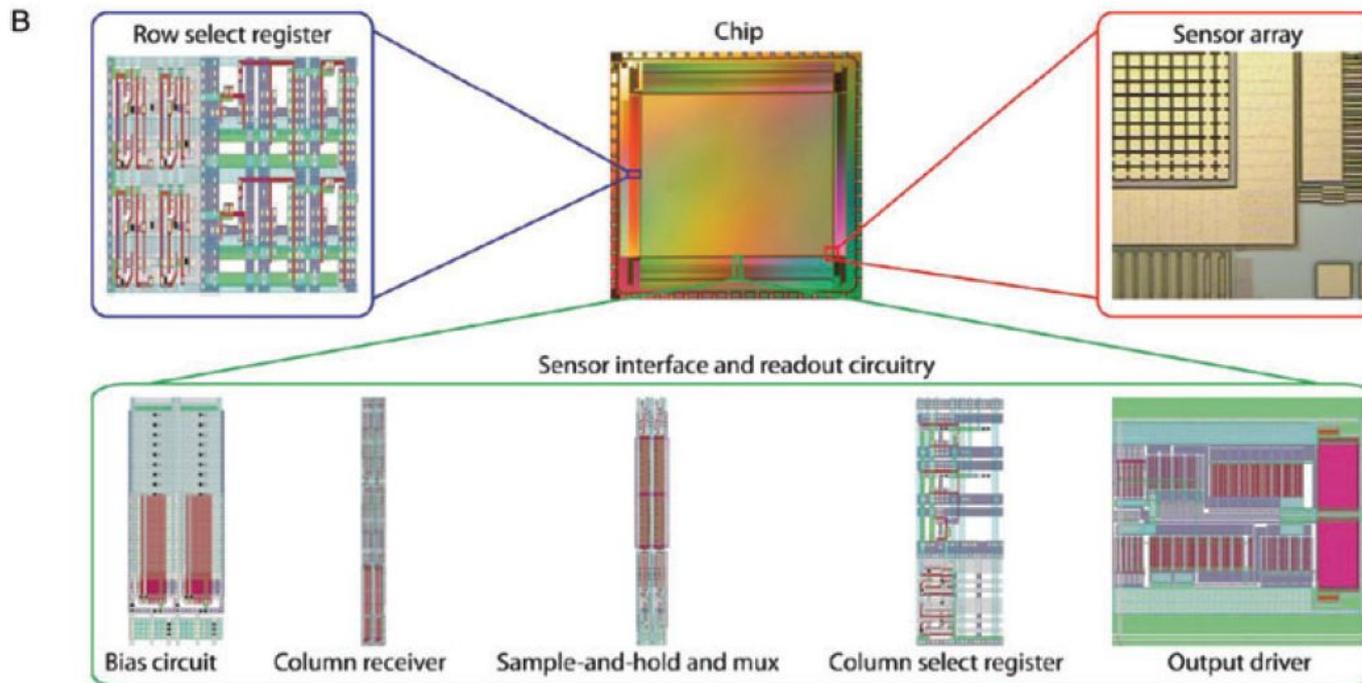
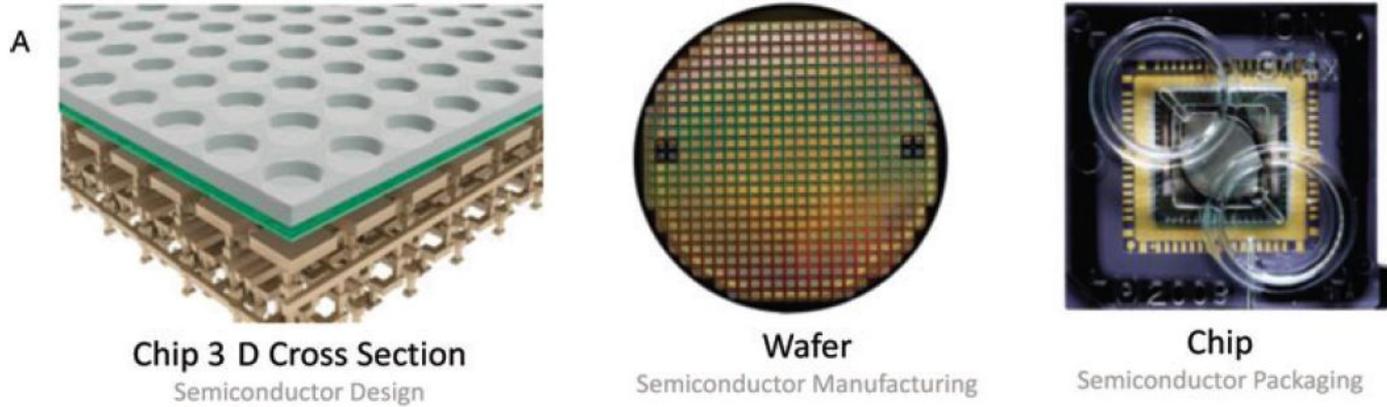


by *life* technologies™

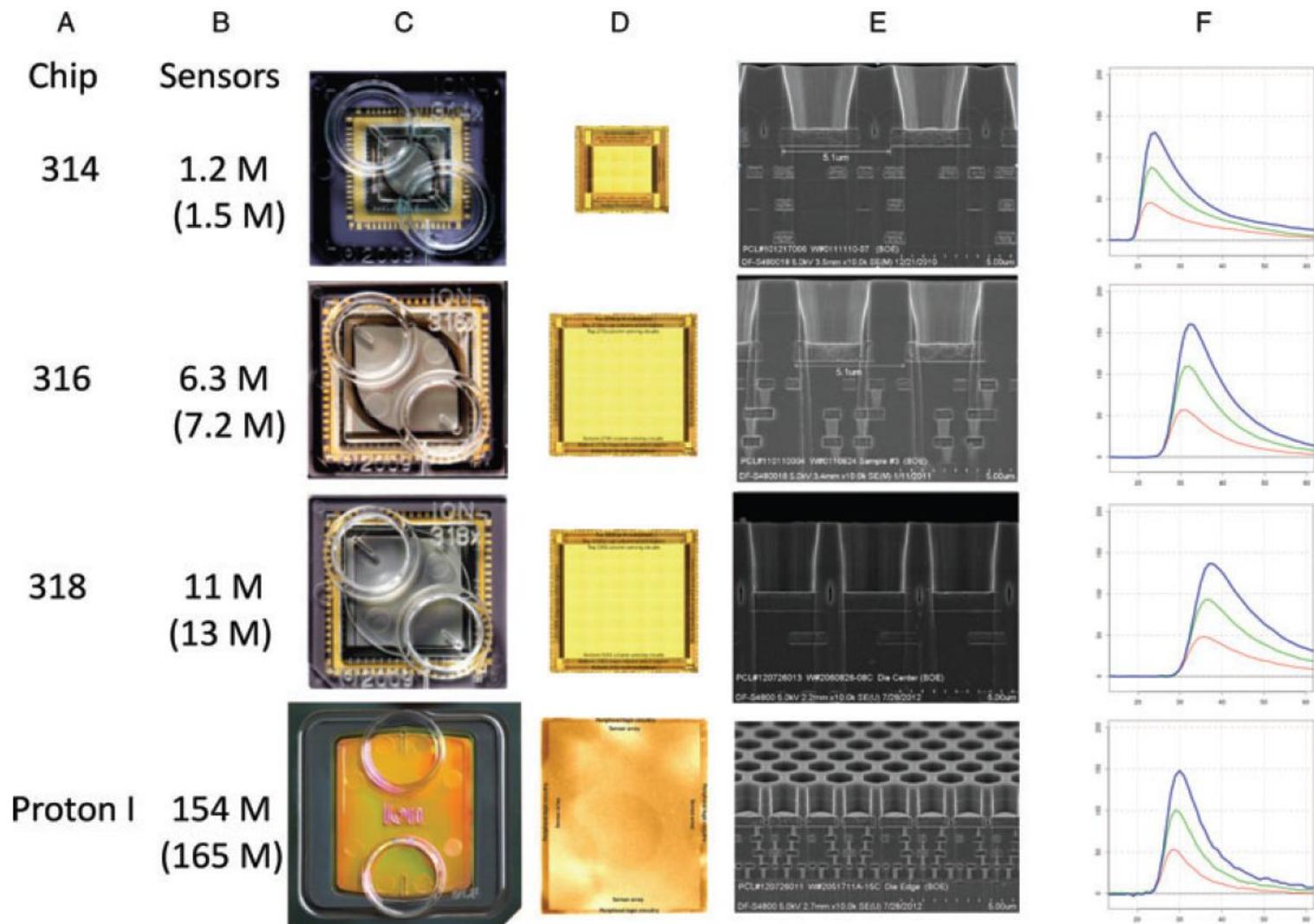
Как работает ионочувствительный полевой транзистор?



Как устроен Ion Chip?

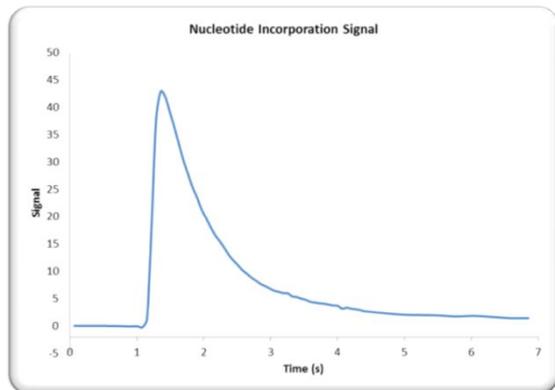


Ion Chip: масштабирование

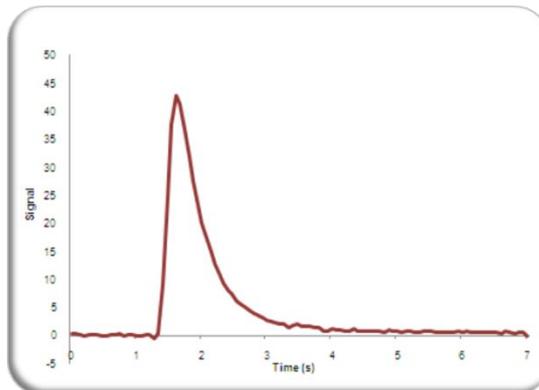


Ion Chip: масштабирование

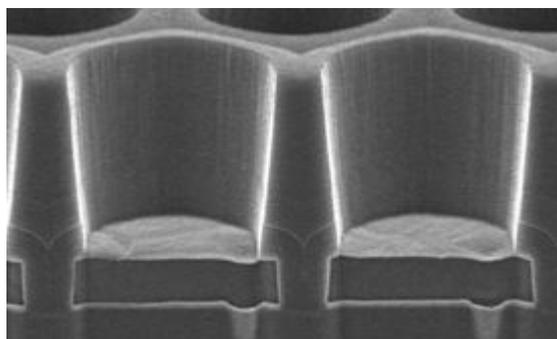
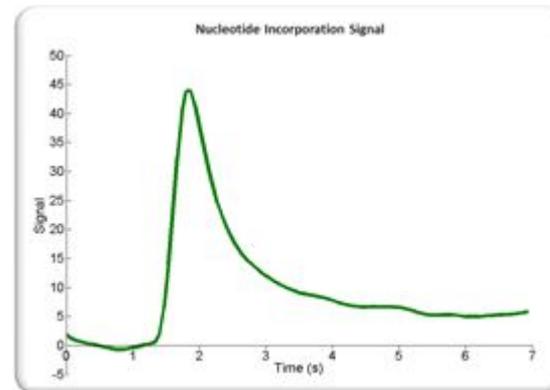
3-Series Signal



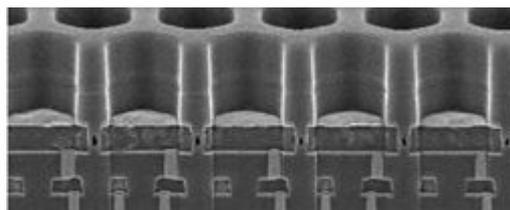
Proton PI Signal



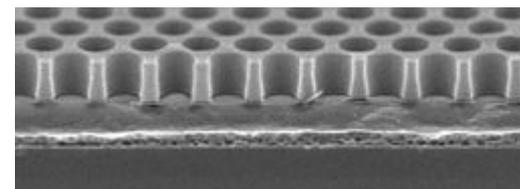
Proton PII Signal



11M wells (318)



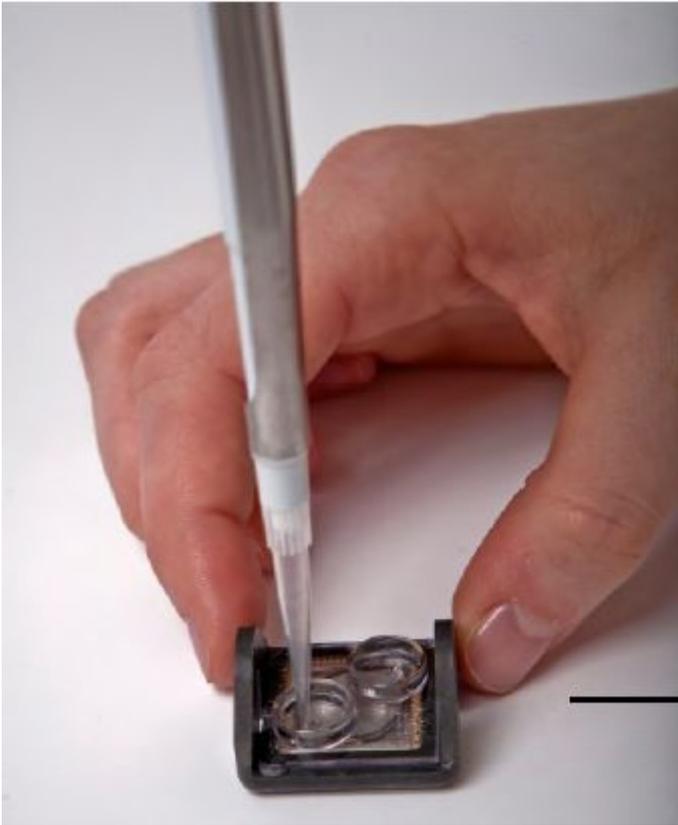
165M wells (PI)



660M wells (PII)



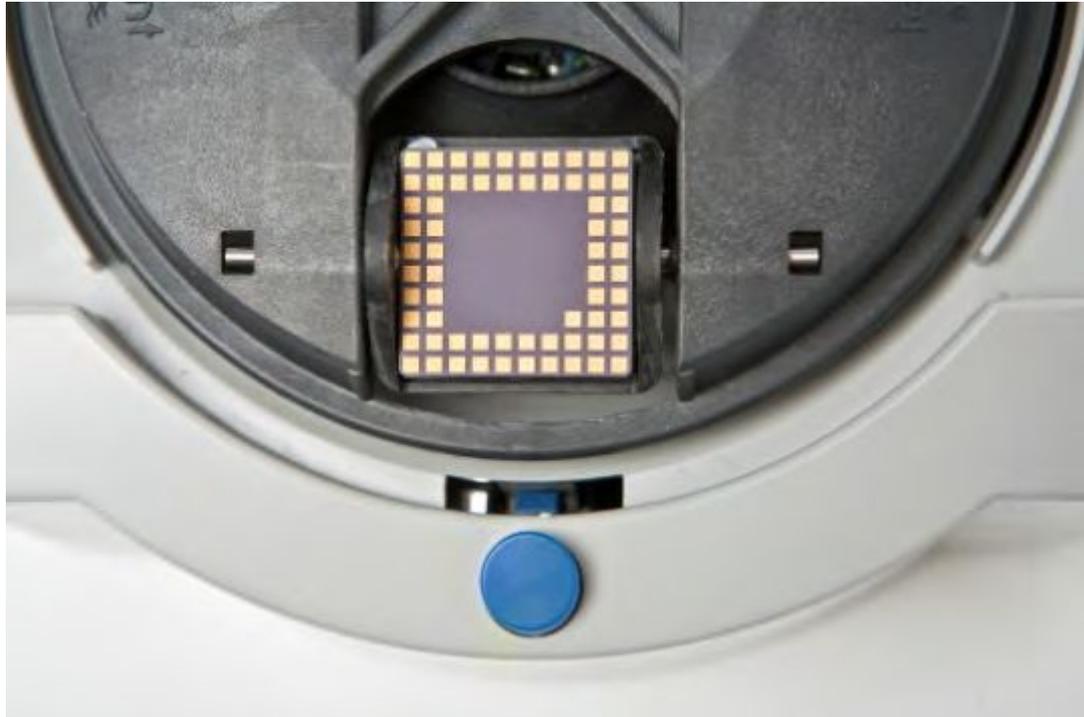
Загрузка на чип



Centrifuge
adapter bucket



Центрифугировать чип «вверх ногами» для удаления остатков жидкости





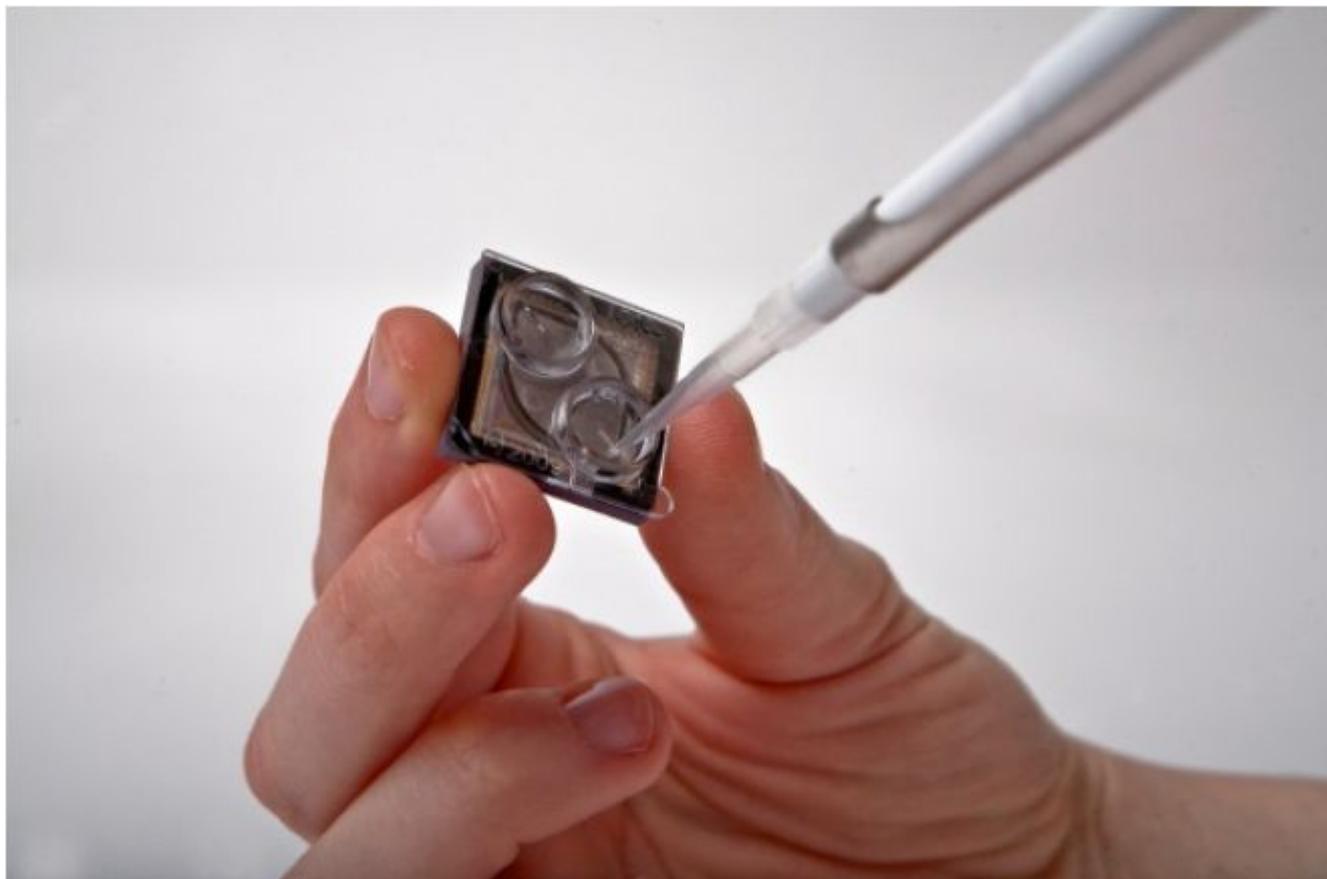
Загрузка
реакционной
СМЕСИ В ЧИП.

Под углом 90°

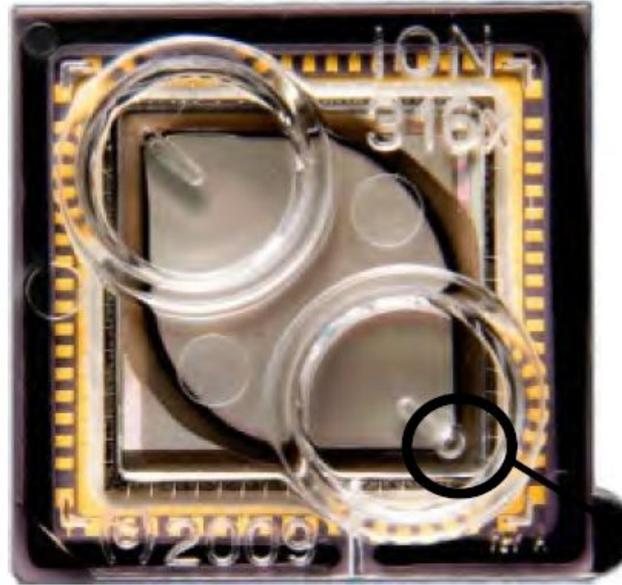
**Simplified Ion PGM™ Chip Loading
with the Ion PGM™ Weighted Chip
Bucket**

Publication Number MAN0007517
Revision 1.0

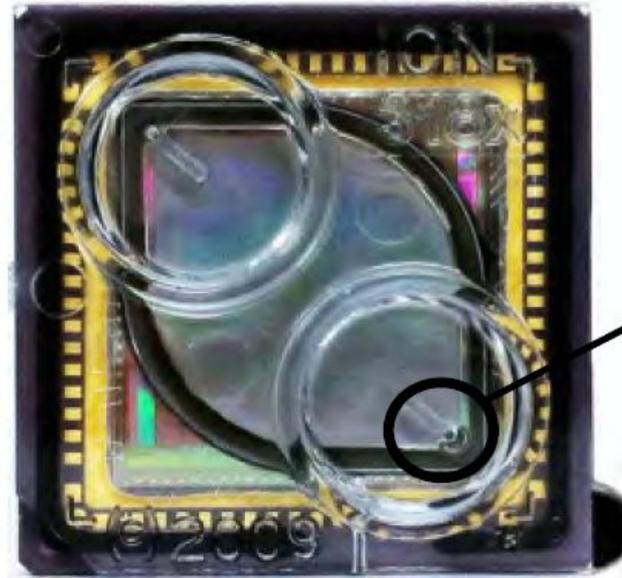
Удалить излишки жидкости с чипа
Под углом 45°



Ion 316™ Chip:



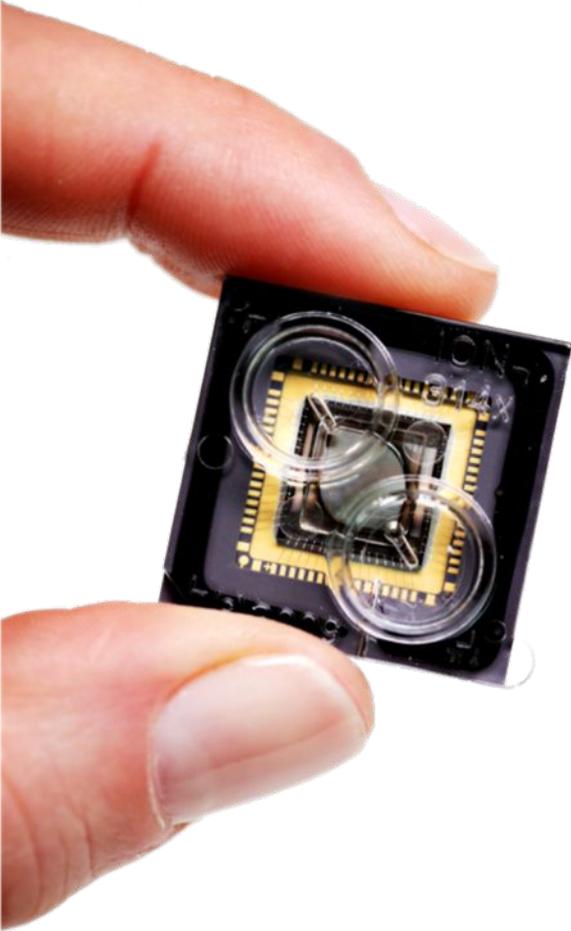
Ion 318™ Chip:



Загрузочный
порт

Внешний вид чипов: Ion 316™ и Ion 318™

Ключевые преимущества технологии Ion Torrent



- Применение немодифицированных нуклеотидов
- Не требуется дорогостоящих и скоропортящихся флуоресцентных реактивов
- Не требуется оптических детекторов и источников излучения
- Компактность получаемых данных

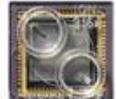




Personal Genome Machine™

Технические характеристики системы Ion PGM™



	Длительность запуска		Производительность*		Кол-во прочтений
	200 п.н.	400 п.н.	200 п.н.	400 п.н.	
Ion 314™ Чип v2 	2.3 часа	3.7 часа	30-50 Mb	60-100 Mb	400-550 тыс.
Ion 316™ Чип v2 	3 часа	4.9 часа	300-600 Mb	600 Mb – 1 Gb	2-3 млн.
Ion 318™ Чип v2 	4.4 часа	7.3 часа	600 Mb – 1 Gb	1.2-2 Gb	4-5.5 млн.

Touchscreen экран



Зажим чипа

Заземление

Включени
е
Реактив
ы

Слив

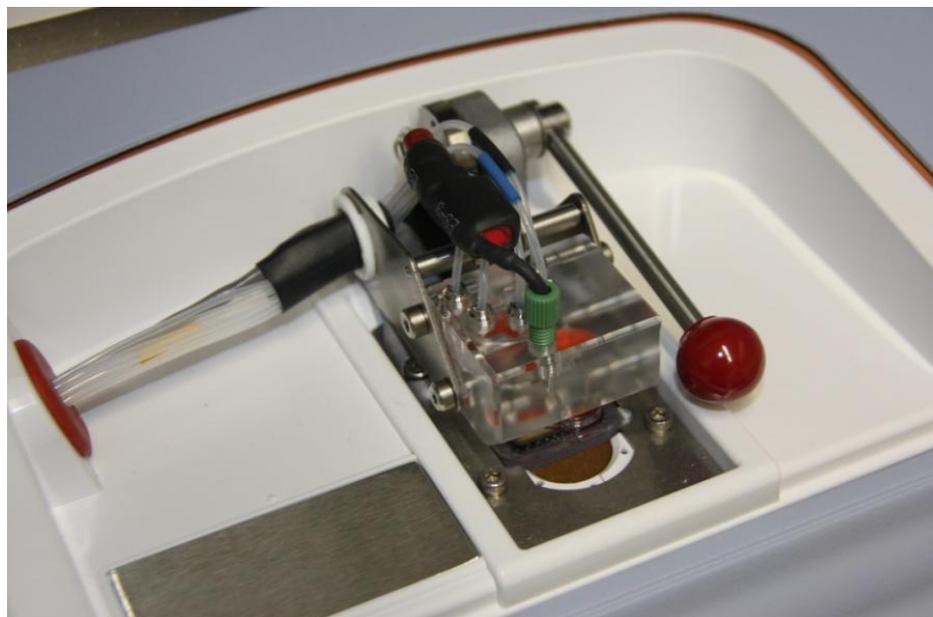
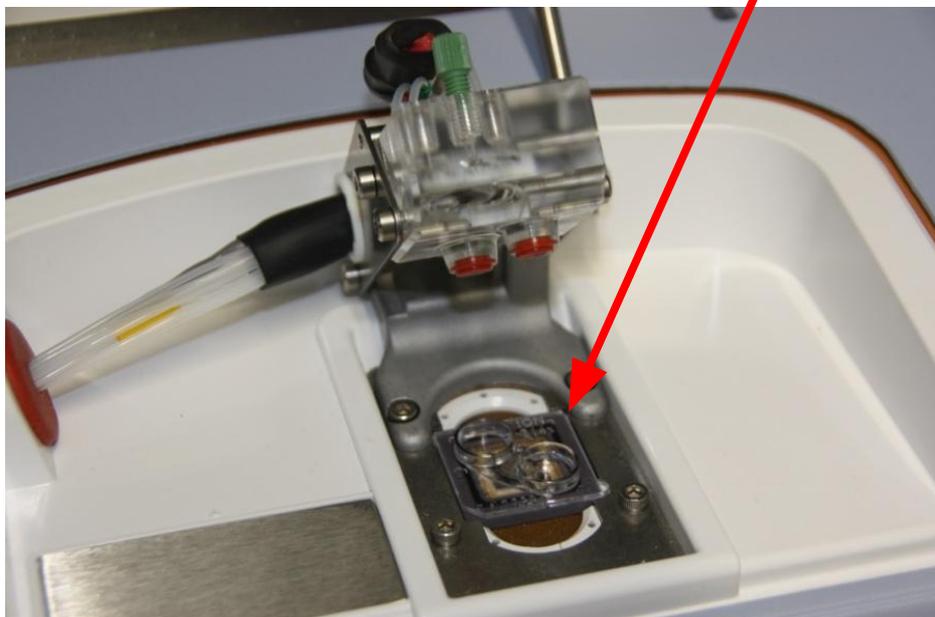
Wash 2

Wash 3

Wash 1

Секвенатор Ion PGM (Personal Genome Machine)

ЧИ
П

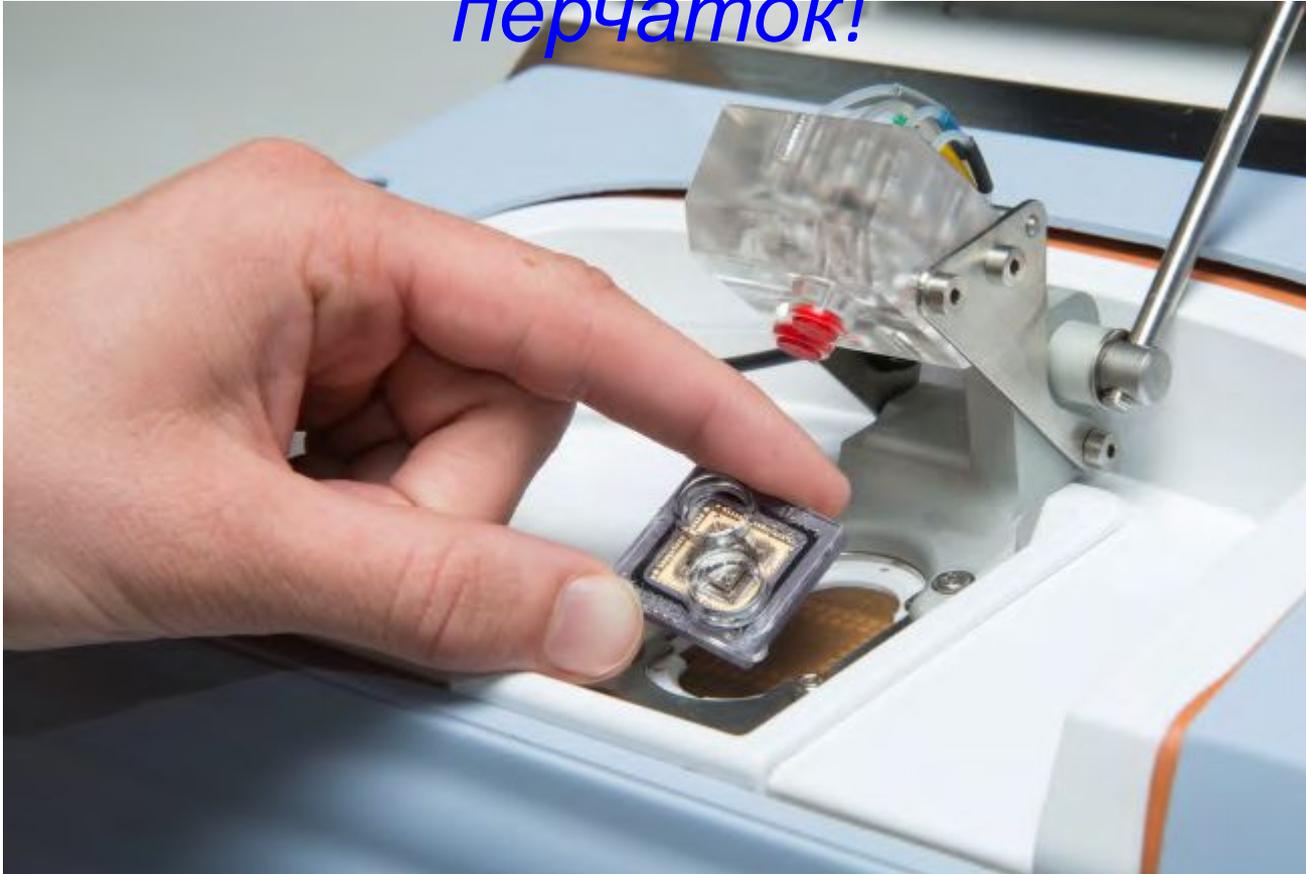


Секвенирование на Ion PGM



Загрузка нового чипа в прибор

Важно: работа без перчаток!



Электростатический разряд может привести к пробое затвора транзистора на чипе и выходу микросхемы из строя.



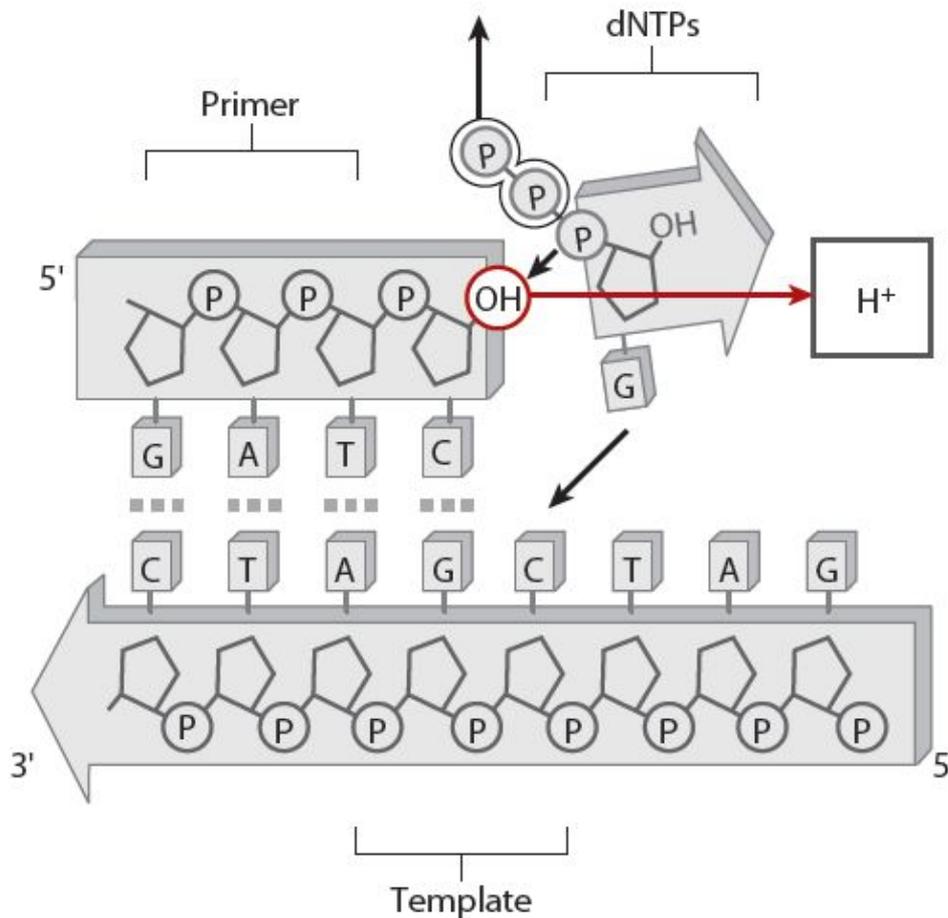
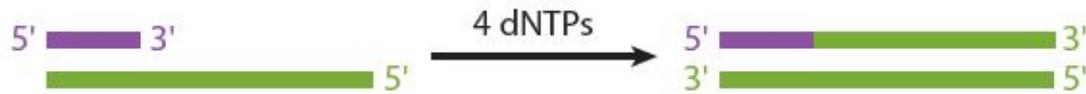
- Создание плана запуска (*рана*)

1. Войти в **Torrent Browser** вашего сервера (Torrent Server), подключенного к секвенатору Ion PGM™.
2. Для создания **Planned Run** войти в **Plan**. Создать план рана.



Управление прибором через сенсорный экран

Секвенирование: подается “поток букв”



Секвенирование: подается “поток букв”

- “Поток” (“flow”) – это пропускание одного из дНТФ (Т, А, С или G) через чип с последующим этапом промывки
- Порядок пропускания дНТФ повторяется:
 - ‘TACGTACGTCTGAGCATCGATCGATGTACAGC’



Цикл 1

Секвенирование: подается “поток букв”

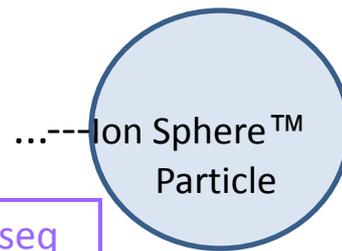
- “Поток” (“flow”) – это пропускание одного из дНТФ (Т, А, С или G) через чип с последующим этапом промывки
- Порядок пропускания дНТФ повторяется:
 - ‘TACGTACGTCTGAGCATCGATCGATGTACAGC’



Цикл 2

Секвенирование: подается “поток букв”

- “Поток” (“flow”) – это пропускание одного из дНТФ (Т, А, С или G) через чип с последующим этапом промывки
- Порядок пропускания дНТФ повторяется:
 - ‘TACGTACGTCTGAGCATCGATCGATGTACAGC’



Цикл 3

Секвенирование: подается “поток букв”

- “Поток” (“flow”) – это пропускание одного из дНТФ (Т, А, С или G) через чип с последующим этапом промывки
- Порядок пропускания дНТФ повторяется:
 - ‘TACGTACGTCTGAGCATCGATCGATGTACAGC’

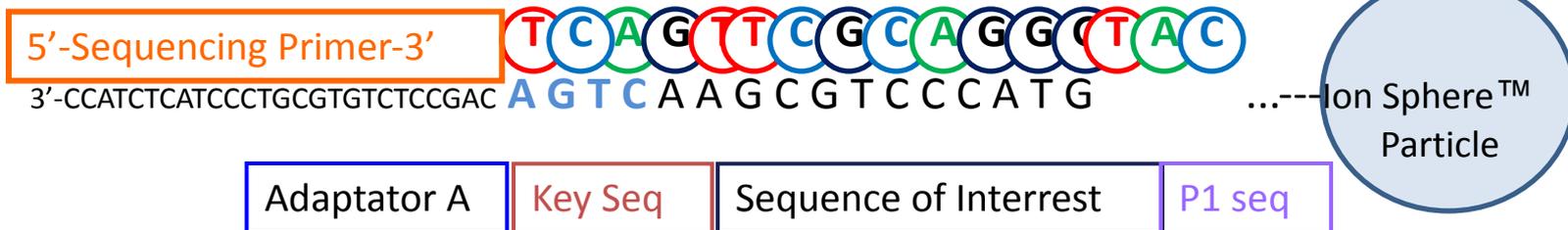


T

C

G

A



И Т.Д....

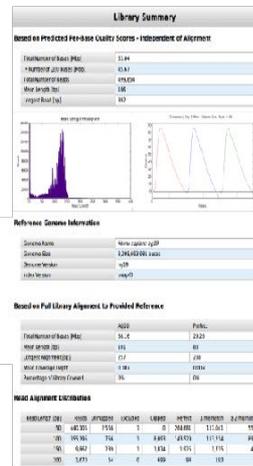
Анализ данных на сервере Torrent Server



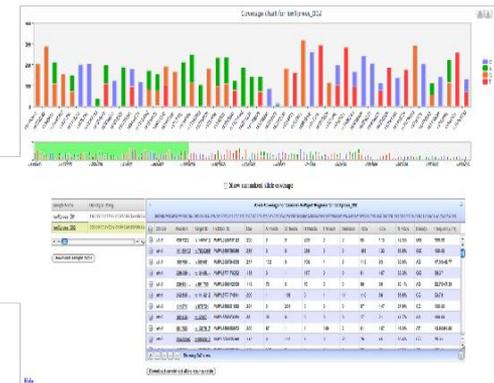
Torrent
Server



Torrent
Browser



Оценка качества в в программе
Torrent suite



Специальные модули
для разных приложений

413 M

Total Bases

74

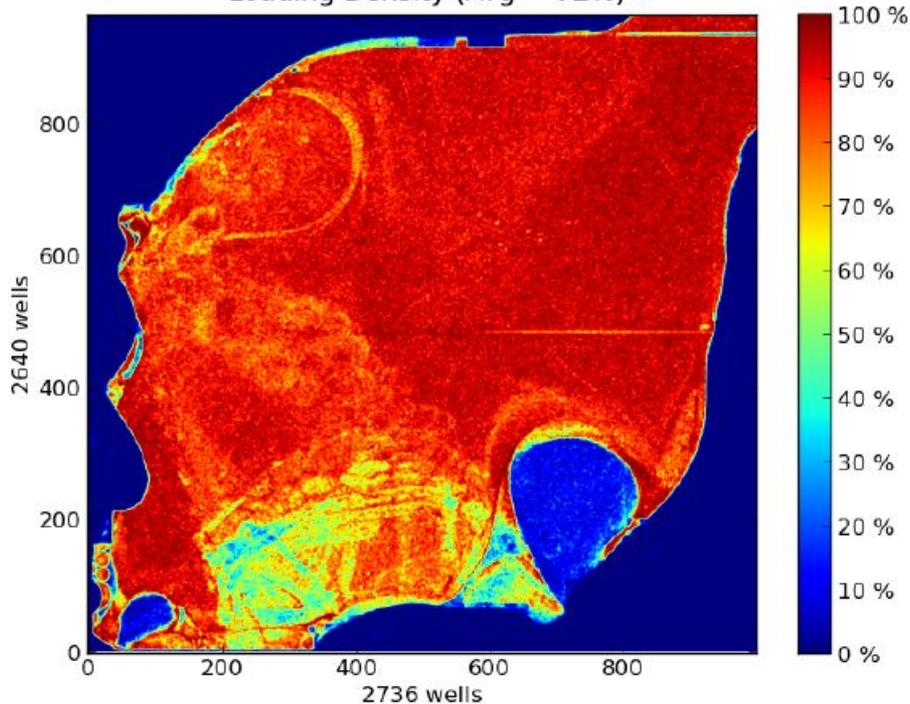
Key Signal

72%

ISP Loading

ISP Density

SN1-23-Run_18
Loading Density (Avg ~ 72%)



Данные о
запуске



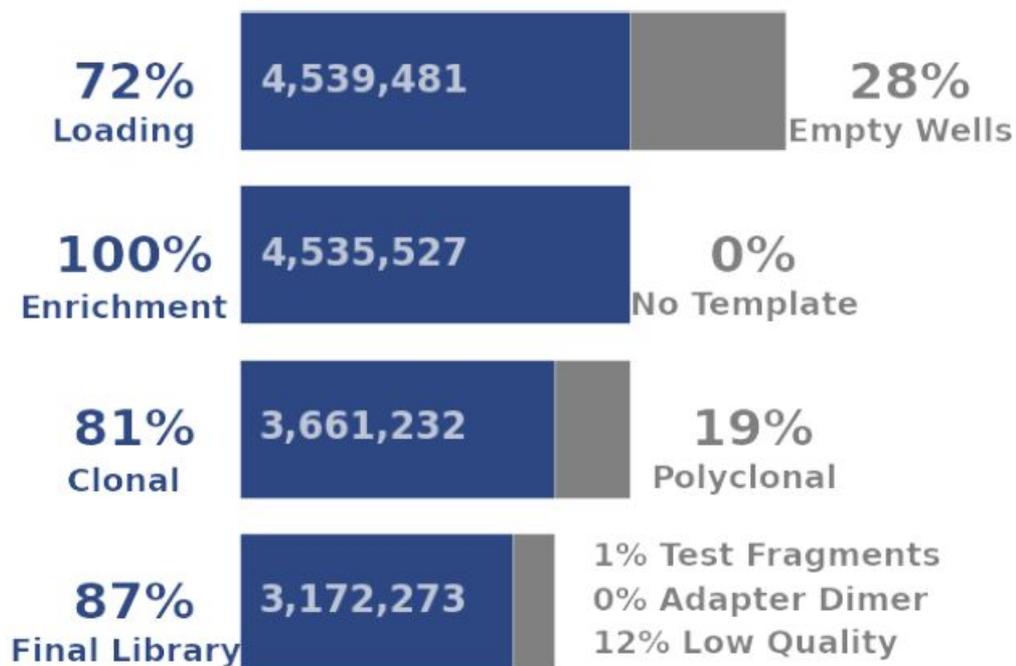
3,172,273

Total Reads

70%

Usable Reads

ISP Summary



Данные о запуске

Addressable Wells 6,348,218

With ISPs	4,539,481	71.5%
Live	4,535,527	99.9%
Test Fragment	31,195	00.7%
Library	4,504,332	99.3%

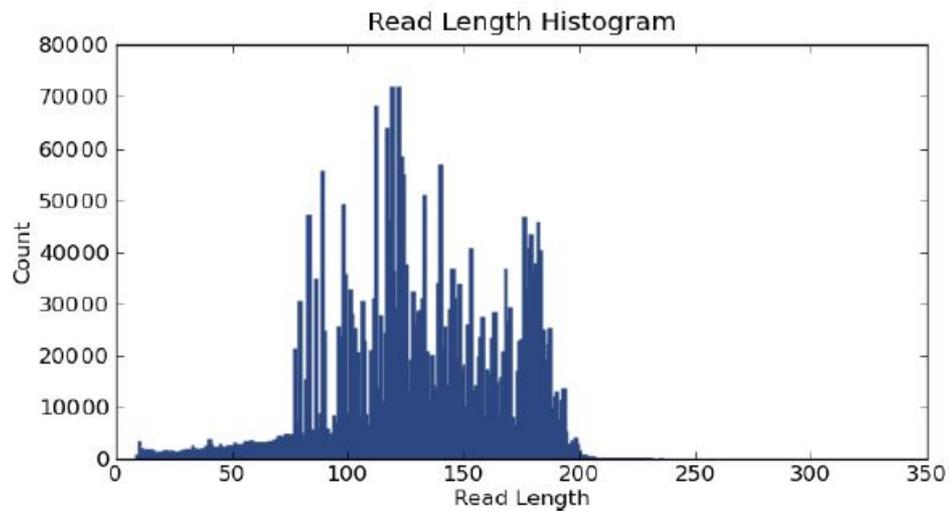
Library ISPs 4,504,332

Filtered: Polyclonal	874,295	19.4%
Filtered: Low Quality	455,551	10.1%
Filtered: Primer Dimer	2,213	00.0%
Final Library ISPs	3,172,273	70.4%



130 bp
Mean Read Length

Read Length



Данные о
запуске



All Plugins



(46 Plugins)

ChIP-Seq



(1 Plugins)

Cloud-based Software



(7 Plugins)

Commercial



(5 Plugins)

de novo Assembly



(2 Plugins)

Epigenetics



(2 Plugins)

Genome Resequencing



(4 Plugins)

Ion Supported



(8 Plugins)

Metagenomics



(0 Plugins)

Microbial Resequencing



(3 Plugins)

miRNA



(0 Plugins)

Quality Control



(7 Plugins)

RNA-Seq



(8 Plugins)

Targeted Resequencing



(9 Plugins)

Utilities



(22 Plugins)

Variant Detection / Annotation



(13 Plugins)

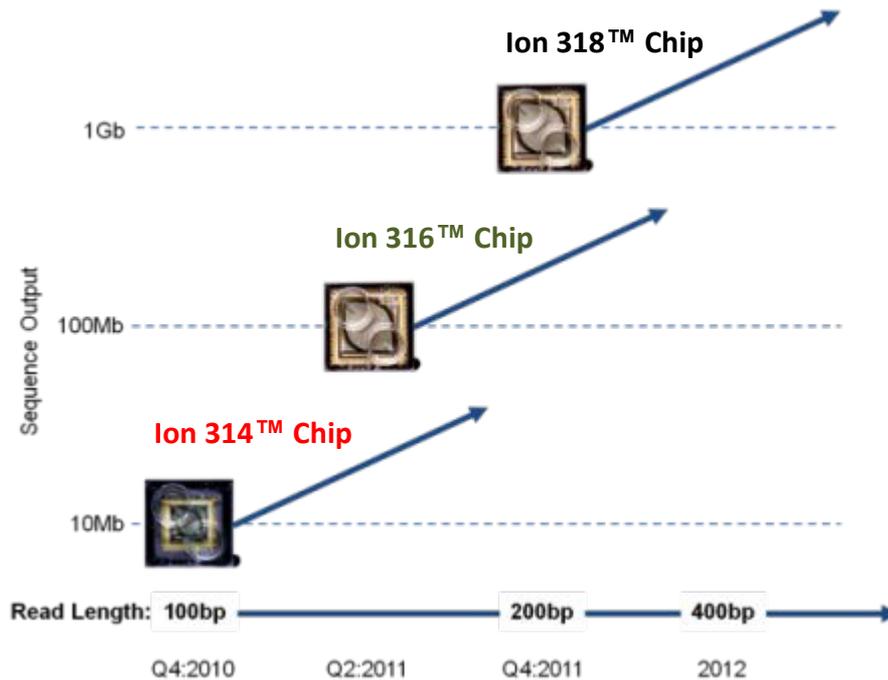
Visualization



(14 Plugins)

Предустановленн ые плагины для анализа данных

Быстрое развитие технологии Ion PGM™ позволяет получать данные, превышающие начальные спецификации



Ion Community
RecognitIION Runs



Ion PGM™ Chip	Ion User	Total bases
314	mack7	392,020,376
316	sandrapintocardoso	1,538,390,202
318	cnservice.ion	2,906,007,126

Результаты запусков на чипе Ion 318

RUN RECOGNITION LEAGUES

Ion 314™

Ion 316™

Ion 318™

Ion PI™

Total Bases

League Total
923 Gb

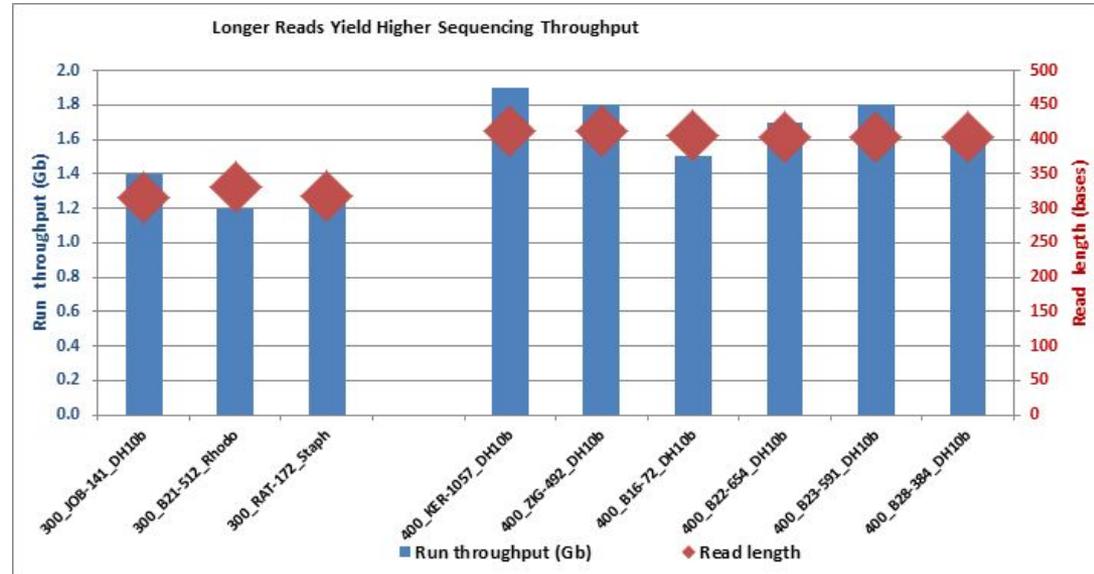
*Only **Total Bases** rankings qualify for run recognition points

1	2,906,007,126 cnservice.ion		Added: 2013-08-15 Run: 2013-08-16
2	2,552,754,781 sivakumarn1		Added: 2013-06-22 Run: 2013-06-22
3	2,531,032,693 ajuantony		Added: 2013-07-28 Run: 2013-07-17
4	2,460,076,539 inaba-hiromi		Added: 2014-05-20 Run: 2014-05-20
5	2,431,739,583 inaba-hiromi		Added: 2014-04-24 Run: 2014-04-24
6	2,418,934,609 biotechnology		Added: 2014-09-27 Run: 2014-09-20
7	2,413,864,491 inaba-hiromi		Added: 2014-07-24 Run: 2014-07-24
8	2,314,240,254 inaba-hiromi		Added: 2014-05-27 Run: 2014-05-27
9	2,298,199,223 brendag		Added: 2013-07-25 Run: 2013-07-22
10	2,294,712,408 inaba-hiromi		Added: 2014-04-29 Run: 2014-04-25

http://ioncommunity.life/technologies.com/community/programs_and_events/run_recognition

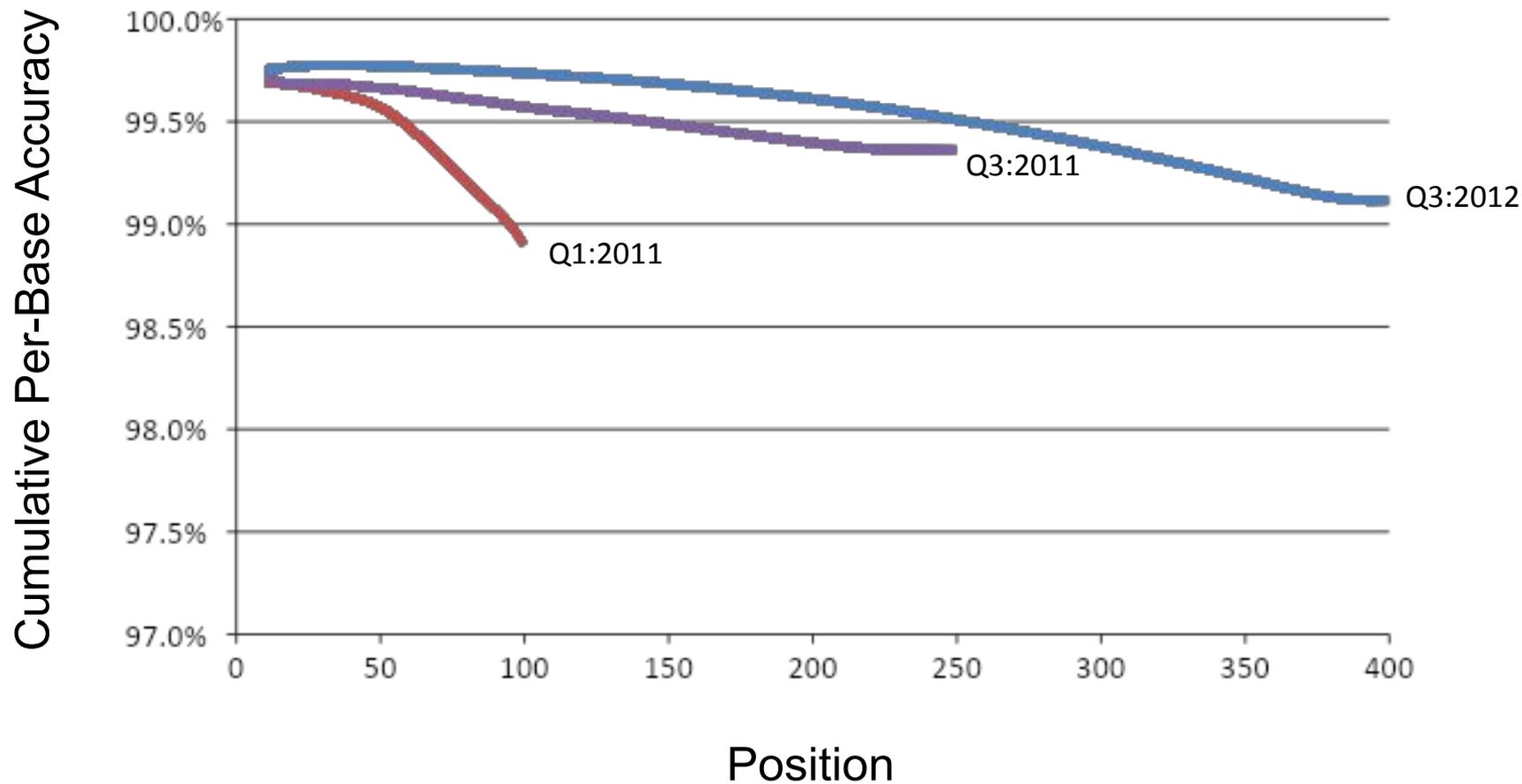
Прочтения длиной 400bp

- Лучшие показатели *de novo* сборки, по сравнению с 2 x 250bp*
- Поддерживается при работе с чипами Ion 314, 316 и 318

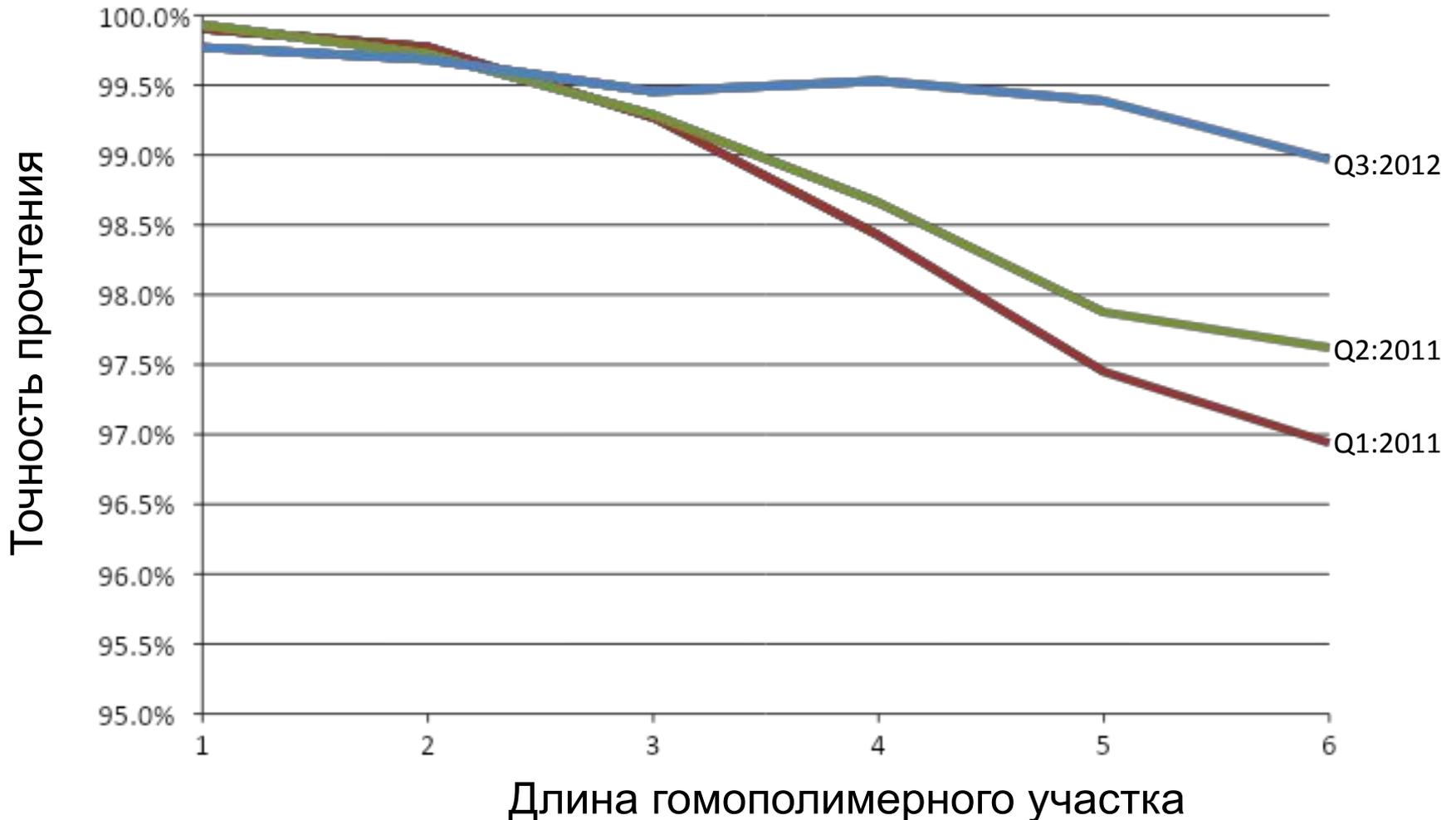


* *De novo* Sequencing on Ion PGM – Application Note

Значительное улучшение качества за 18 месяцев...



...Даже более значительное для
СЛОЖНЫХ последовательностей



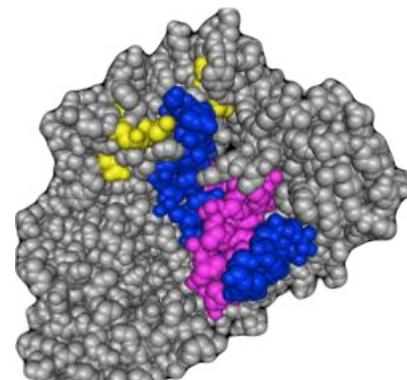
Надежное секвенирование мутаций *Ion AmpliSeq BRCA1/2 Community Panel*

BRCA2: insA	(TTGTGAAAAAAAAACAGG)
BRCA1: delTTCA	(GCTGACATTCAGAGTGAA)
BRCA1: dup	(ATAAAAAAGCAAGAATAT)
BRCA2: delGAGAA	(AAAAAGAAAGAAACTAG)
BRCA2: delTTAA	(ATGAAACAATTAATAAAGT)
BRCA2: G>A	(AAGACTAGG>AAAAAAAATTTTC)
BRCA2: delGT	(ATAAACTGTAAGTGAAAAAAT)
BRCA1: G>C	(GCAAAAAAGG>CGTAATGGCAAA)
BRCA1: delA	(AAAGAAAAAAAAAGTACAA)
BRCA2: dupA	(GGAAAAAAAAATACCGAAAGAC)
BRCA1: delAG	(TCTTAGAGTGTCCCATC)
BRCA2: del4	(TGATAACAAGCAACCC)
BRCA2: delG	(TACGTATGGCGTTTCTAA)
BRCA1: del4	(CACATCACTTTAACTAATCTAA)
BRCA1: insC	(AGAATCCCAGGACAGA)
BRCA1: insCC	(TGGAGCCAAG>CCAAGAGTAACA)
BRCA1: delCT	(GTGTCCAACCTCTAACCCTTGG)
BRCA2: delTT	(ATTGCATAACTTTTCCTTAA)
BRCA2: dup120	(20 nucleotides duplication)



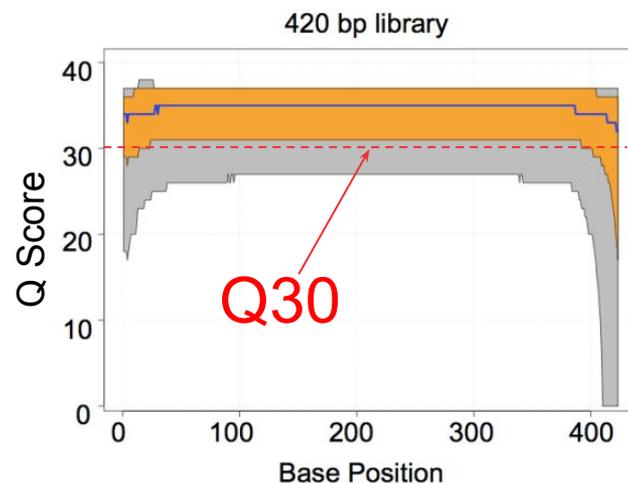
Высокоточная полимераза Hi-Q™ для достоверного выявления инсерций и делеций

- Скрининг методом молекулярной эволюции более 10,000 мутантов ДНК-полимеразы
- Обнаружено более 10 высоко-точных кандидатов
- Создание нового фермента Hi-Q™ позволило существенно снизить количество ошибок при выявлении инсерций и делеций



- **Точность для всех оснований**

Новая полимераза Hi-Q™ для получения 420-нуклеотидных прочтений на Ion PGM™





Ion Proton™ System

Ion Proton™ System

Самый быстрый полногеномный секвенатор



- *Runs all Ion P-Series chips (no paid upgrade required)*
- *Benchtop system containing state-of-the-art electronics to support the highest throughput*
 - *Dual 8-core Intel® Xeon® Sandy Bridge processors*
 - *128 GB of RAM*
 - *Dual Altera® Stratix V FPGAs*
 - *NVIDIA® Tesla® C2075 GPU*
 - *11 TB of hybrid (SSD&HDD) storage*
 - *Ubuntu® 11.10 operating system*

Технические характеристики системы Ion Proton™



	Длительность запуска		Производительность*		Кол-во прочтений
	100 п.н.	200 п.н.	100 п.н.	200 п.н.	
Ion PI™ Чип 	1.8 часа	3.4 часа	До 5 Gb	До 10 Gb	70-90 млн
Ion PII™ Чип 	Не более одного дня		До 30 Gb	До 60 Gb	200-300 млн

Чип Ion PI™ для ЭКЗОМОВ и транскриптомов; Чип Ion PII™ для ЦЕЛЫХ ГЕНОМОВ

Ion PI™ Chip

165 М лунок

До 10 Gb

70-90М
отфильтрованных
прочтений

1-2 экзона

1-4 транскриптома

Ion PII™ Chip

660 М лунок

Геном человека с 20X
прочтением

240-320М
отфильтрованных
прочтений

4-8 экзенов

4-16 транскриптомов

RUN RECOGNITION LEAGUES

RUN RECOGNITION LEAGUES							
Ion 314™		Ion 316™		Ion 318™		Ion PI™	
Total Bases			League Total		5,222 Gb		
*Only Total Bases rankings qualify for run recognition points							
1	20,573,877,042		Added: 2013-08-29				
	richard.allcock		Run: 2013-08-29				
2	20,188,674,746		Added: 2014-05-22				
	richard.allcock		Run: 2014-05-22				
3	19,454,437,130		Added: 2014-08-14				
	amiseli		Run: 2014-08-10				
4	19,420,792,934		Added: 2014-03-06				
	richard.allcock		Run: 2014-03-06				
5	19,225,981,604		Added: 2013-07-28				
	moonsrsr		Run: 2013-07-25				
6	19,046,449,295		Added: 2014-03-20				
	aikow		Run: 2014-03-18				
7	18,958,764,759		Added: 2014-03-20				
	richard.allcock		Run: 2014-03-20				
8	18,870,720,047		Added: 2014-02-26				
	richard.allcock		Run: 2014-02-25				
9	18,682,624,903		Added: 2014-02-22				
	kyap		Run: 2014-02-22				
10	18,568,455,554		Added: 2014-04-04				
	vanhar		Run: 2014-04-03				

http://ioncommunity.lifetechnologies.com/community/programs_and_events/run_recognition

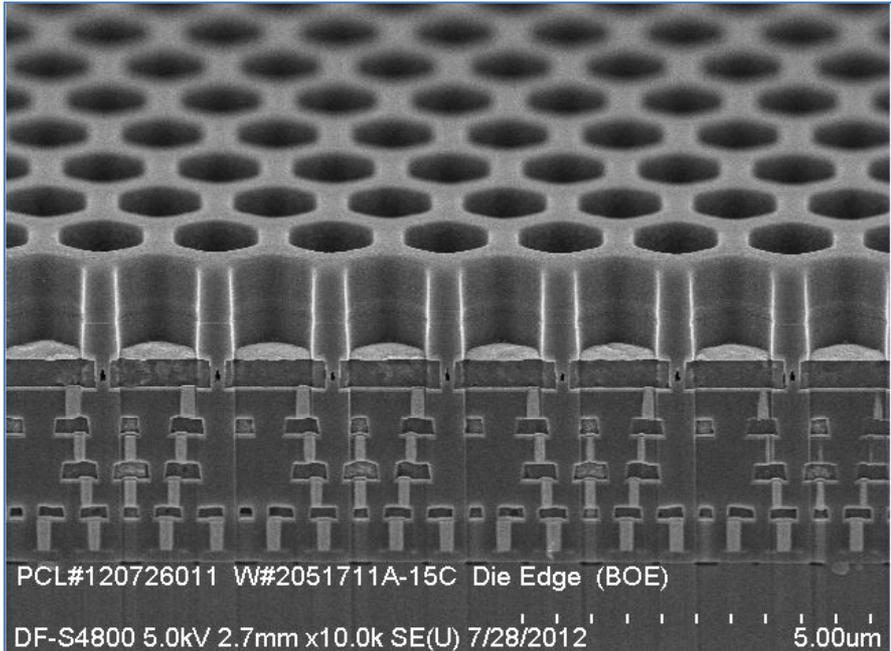
Результаты
запусков
на чипе PI™

>200 bp

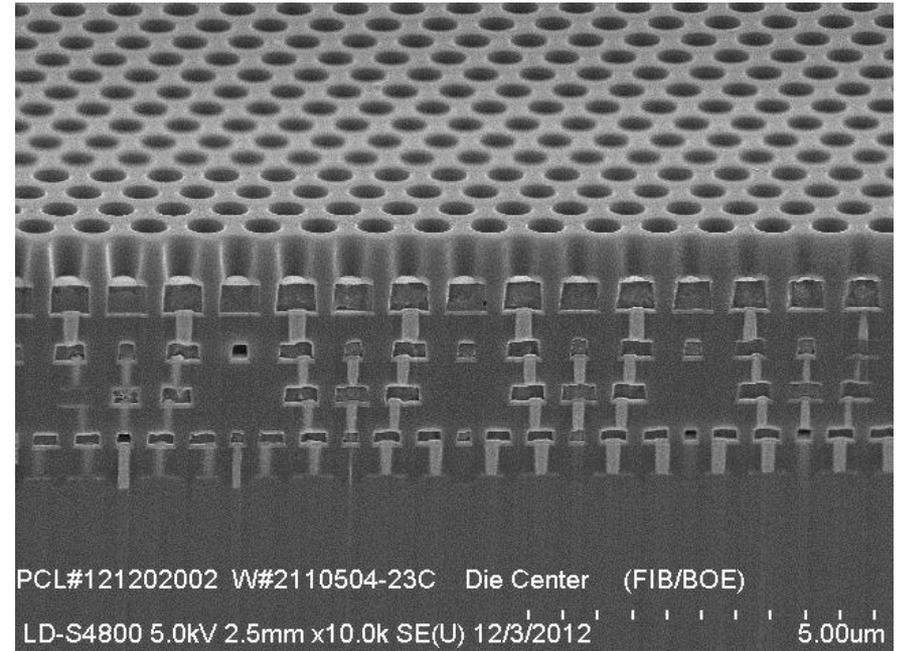
10-15 Gbp

70-80*10⁶

Чип PII



PI 1.68 um pitch
165 M
сенсоров

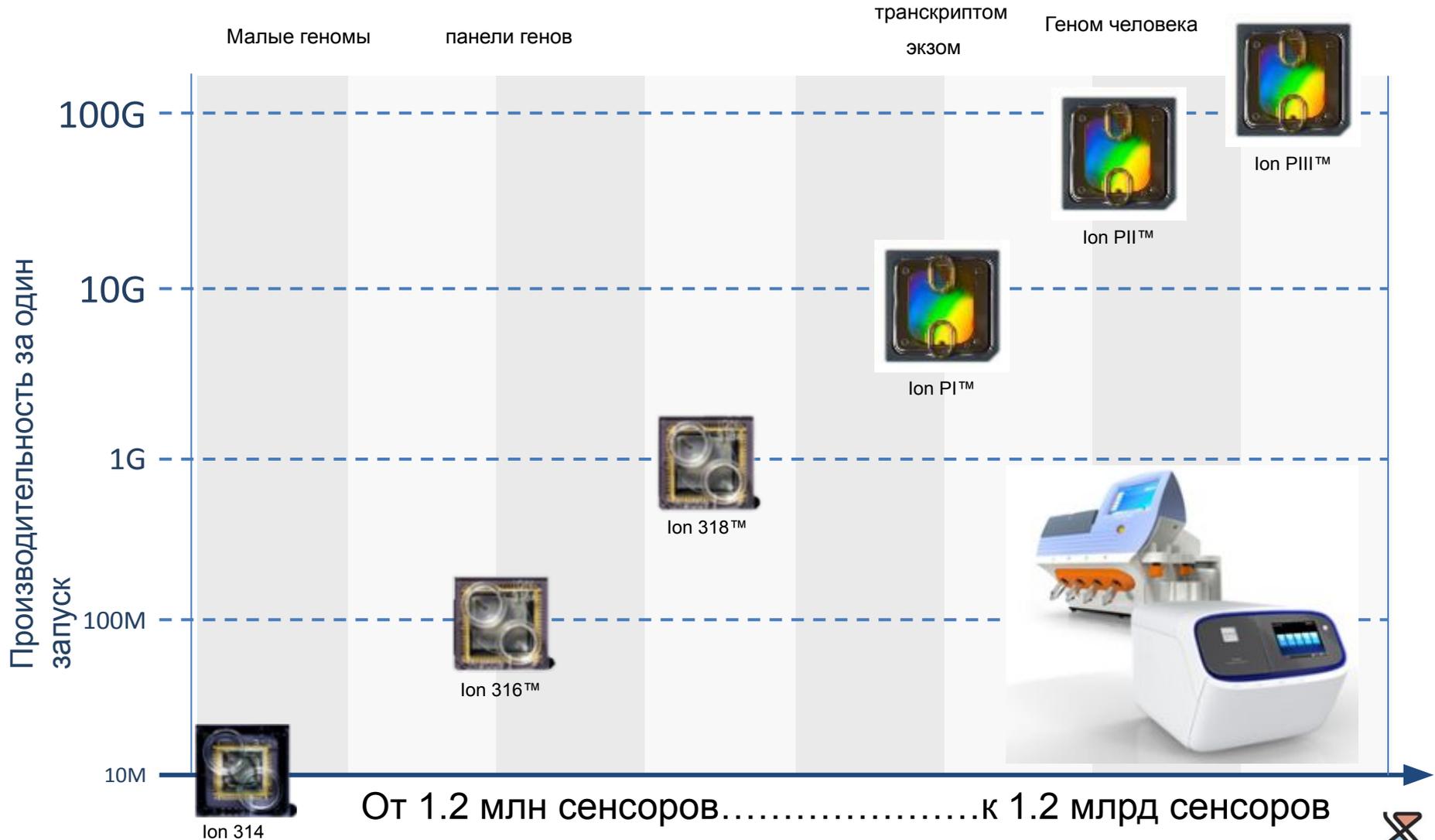


PII 0.84um pitch
660 M
сенсоров



Масштабируемость

10,000-кратная от Ion 314™ к Ion P111™



Сервер Ion Reporter™

Simple push-button informatics enables any lab to do next generation sequencing

- **HIPAA compatible**
- Combined **hardware / software** solution
- Data remains on site – greater control
- Faster uploads
- Unlimited users / analyses
- **Support for up to 4 PGMs / Protons**

Hardware specs

Dual 8-core 2.9 GHz CPUs

128 GB RAM

2x NVIDIA Tesla GPUs

20TB of usable storage

Ubuntu 10.04



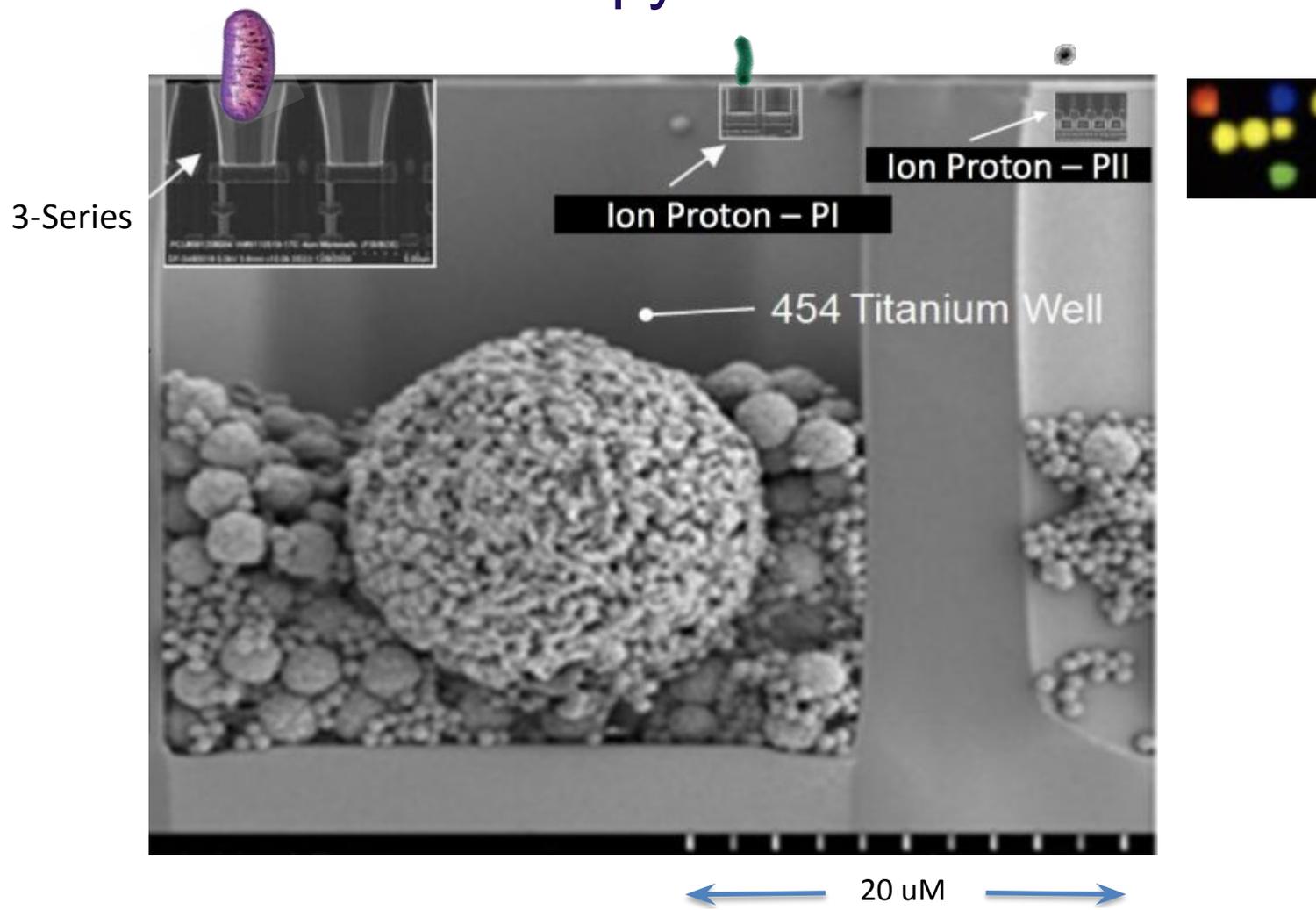
Чип Ion PII™: Видео камера на 660 мегапикселей

По сравнению с чипом P1™:

- В 4х раза больше транзисторов для увеличения производительности
- В два раза большая скорость передачи данных для ускорения анализа
- Более высокое соотношение сигнал/шум



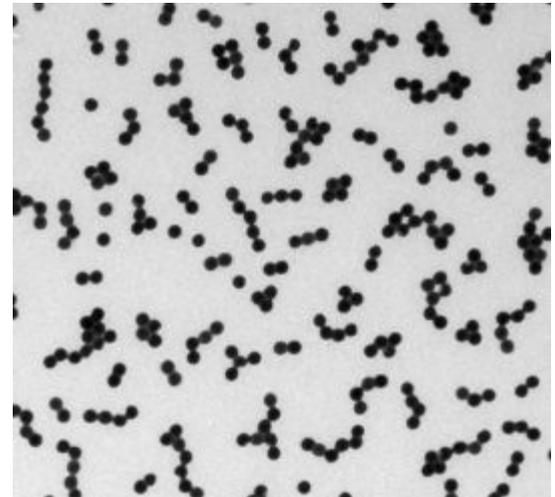
Масштабируемость лунок чипа – от митохондрий к вирусам



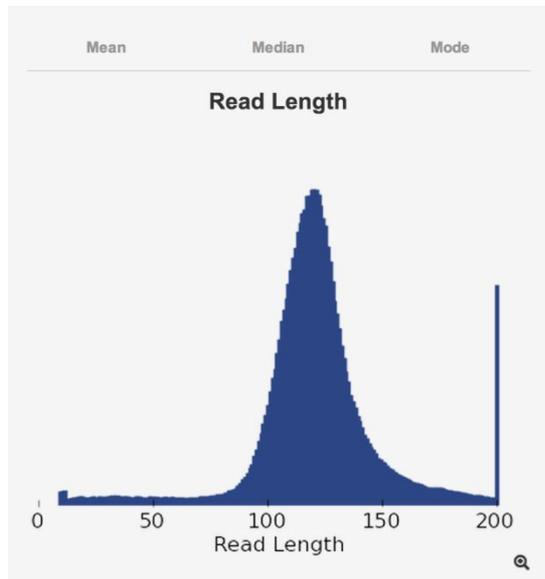
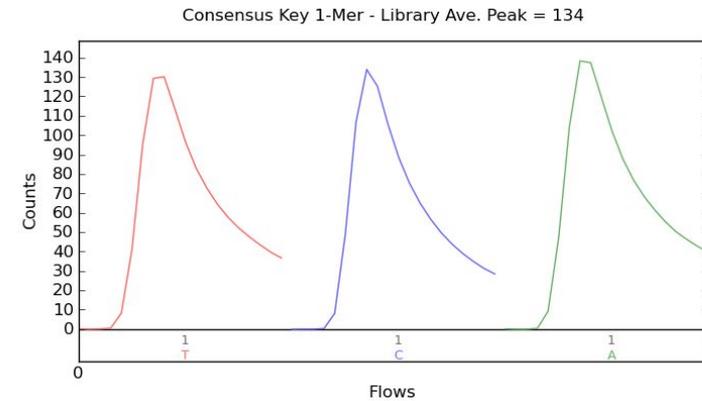
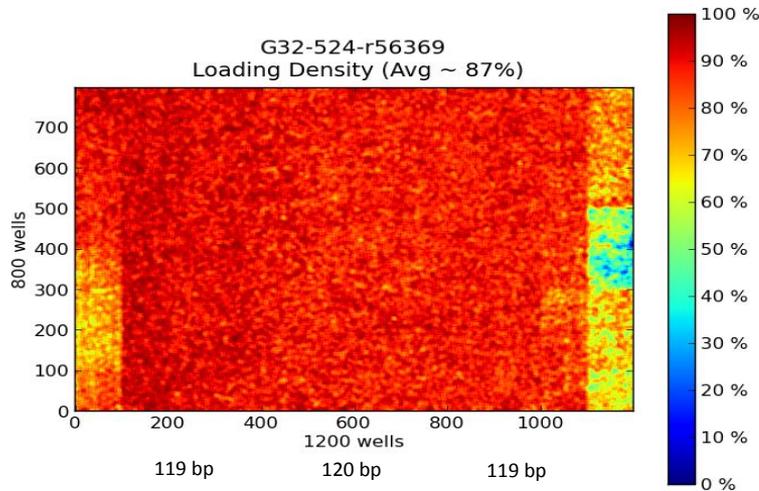
Сотрудничество внутри компании: Life Technologies/Dynal™

- Партнерство в R&D с ноября 2010
- Оптимизация производства и контроль размера (воспроизводимость 20 нм)
- Ключевые аспекты:
 - Уменьшение адгезии
 - Улучшение загрузки чипа

Микросферы
(450 нм)

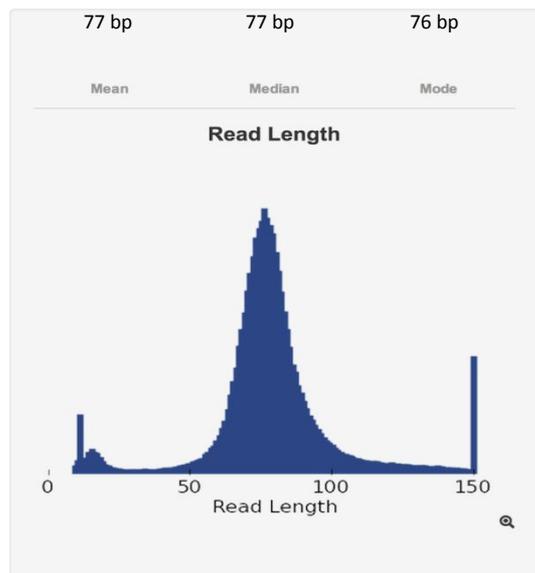
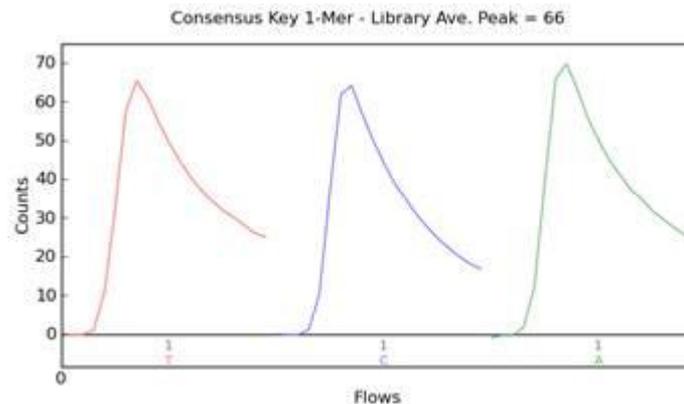
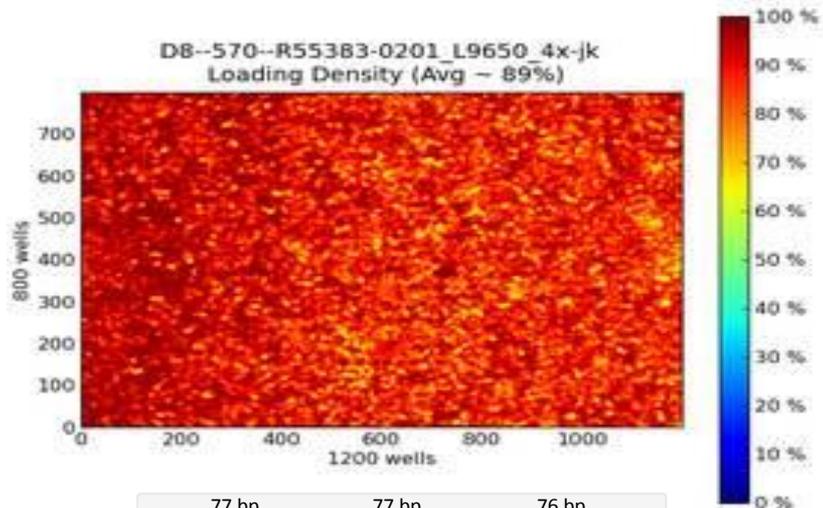


Секвенирование фрагментной библиотеки на чипе Ion PII™



- 125 пн фрагментная библиотека, геном человека
- 371 М прочтений (экстраполяция с одного квадранта)

Результаты секвенирования транскриптома на чипе Ion PII™

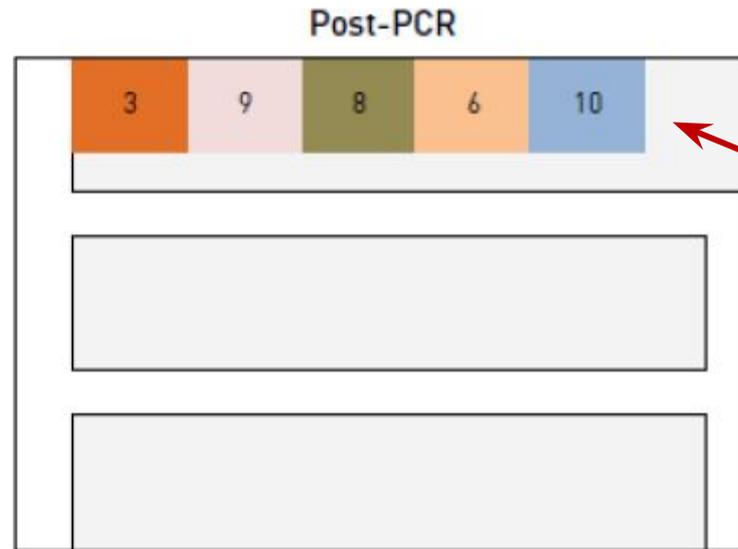
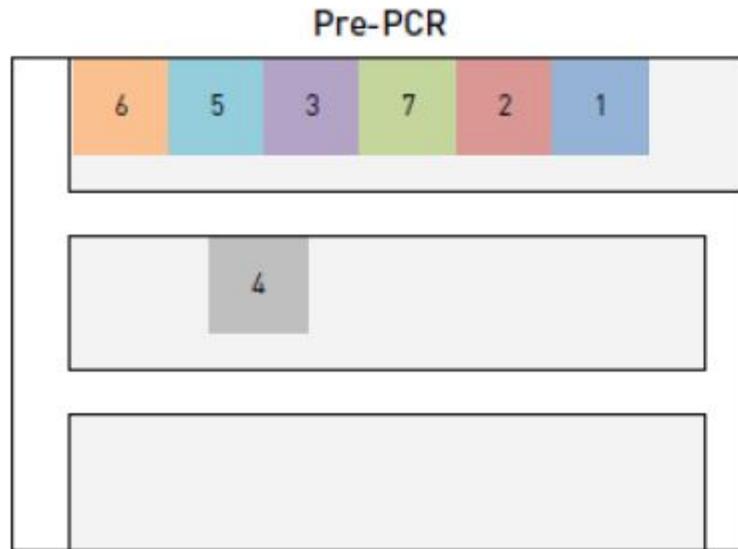


- 75 пн Транскриптомная б-ка от Andrea Kohn из лаборатории Леонида Мороза, U. Florida
- Библиотека получена с помощью Clontech SMARTer™ cDNA Kit
- 342М прочтений (экстраполяция)
- Хороший Key Signal (~65)

Планировка помещений для NGS



2 комнаты

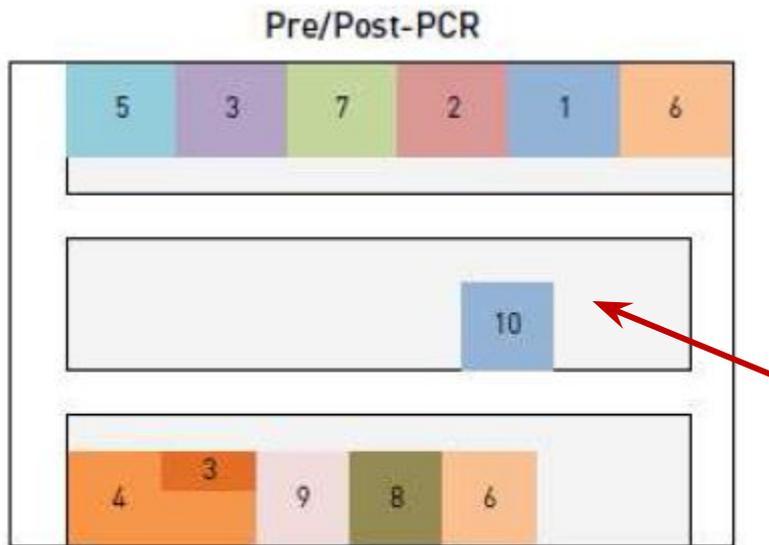


- 1 Bioanalyzer
- 2 [Optional] Bioruptor
- 3 Centrifuge
- 4 Amplification mixture setup hood
- 5 Library area setup hood

- 6 Pipettes
- 7 [Optional] PippenPrep™
- 8 Qubit
- 9 Thermal Cycler
- 10 Ion PGM™ Instrument and Torrent Server



1 комната



- 1 Bioanalyzer
- 2 [Optional] Bioruptor
- 3 Centrifuge
- 4 Amplification mixture setup hood
- 5 Library area setup hood

- 6 Pipettes
- 7 [Optional] PippenPrep
- 8 Qubit
- 9 Thermal Cycler
- 10 Ion PGM™ Instrument and Torrent Server

