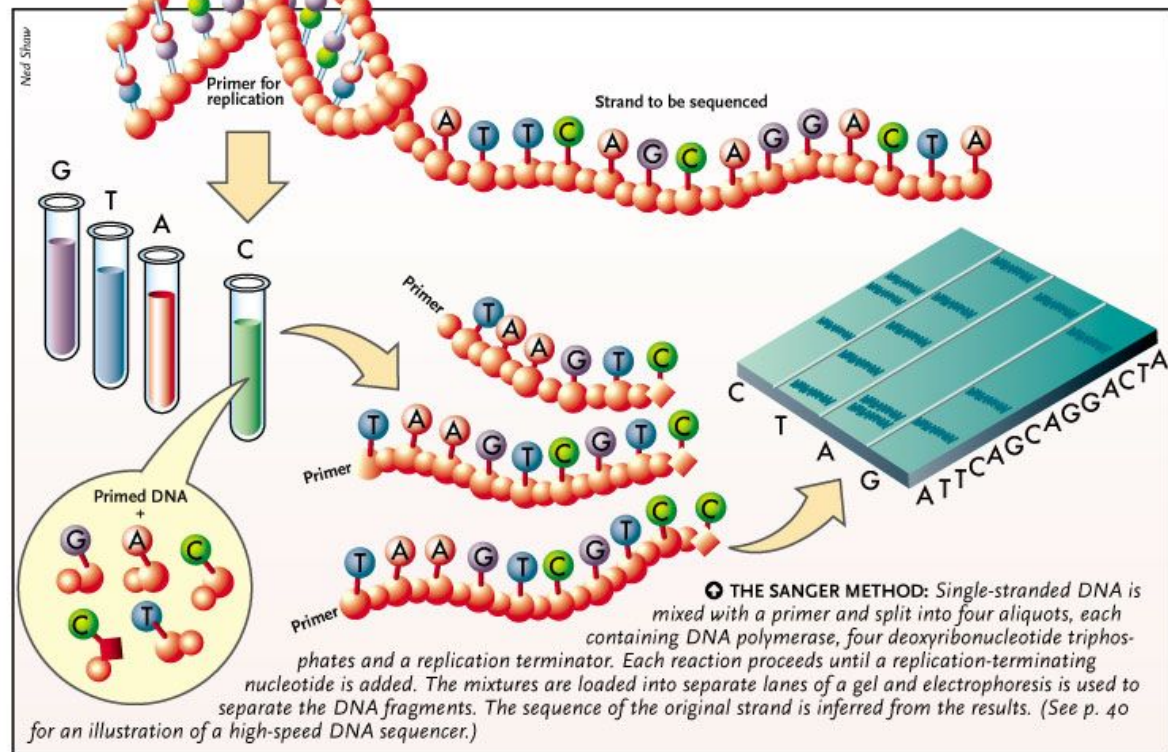


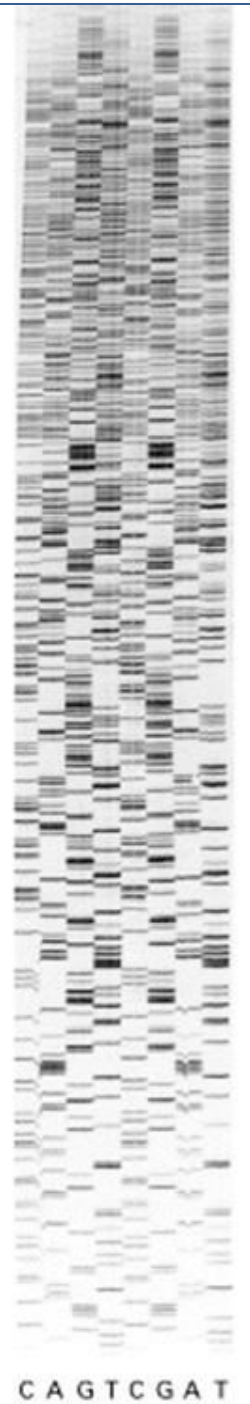
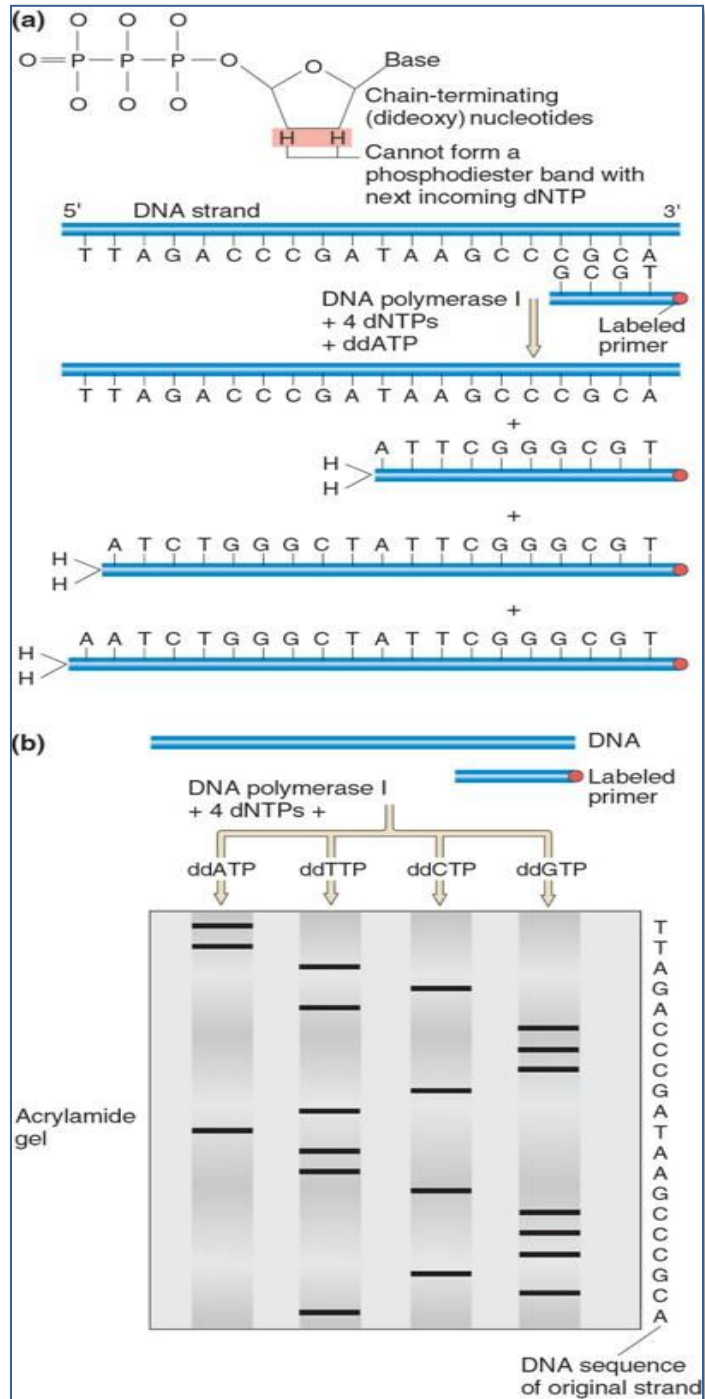
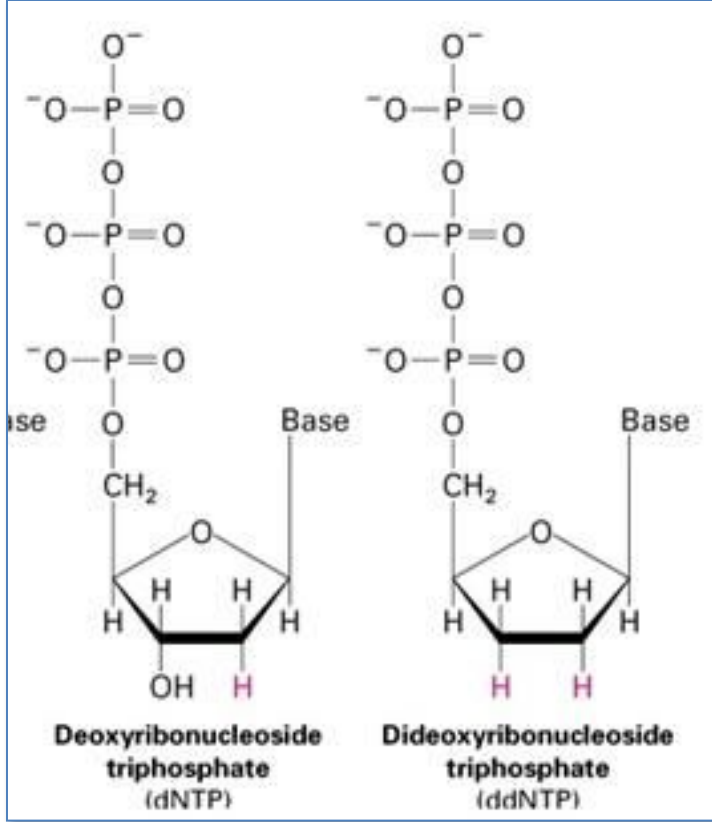
Секвенирование



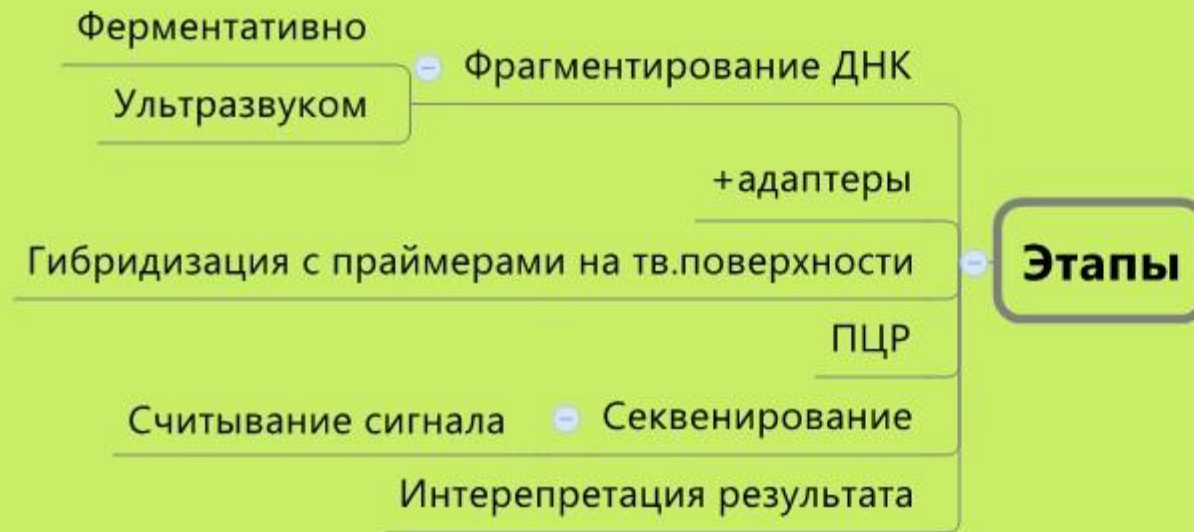
Метод «терминаторов»

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, Г или С) метится радиоактивными изотопами. Короткие молекулы “убегают” вперед, а длинные остаются на старте. Таким образом можно определить последовательность нуклеотидов.

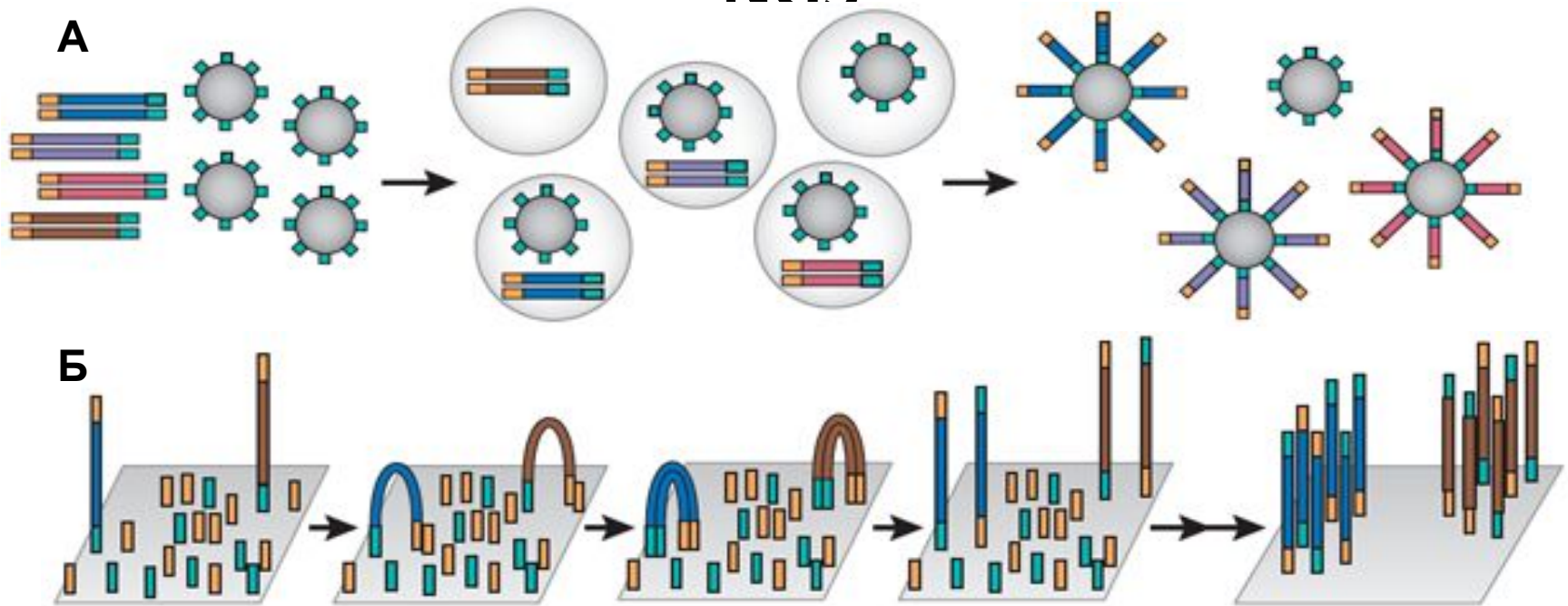




Основные этапы секвенирования



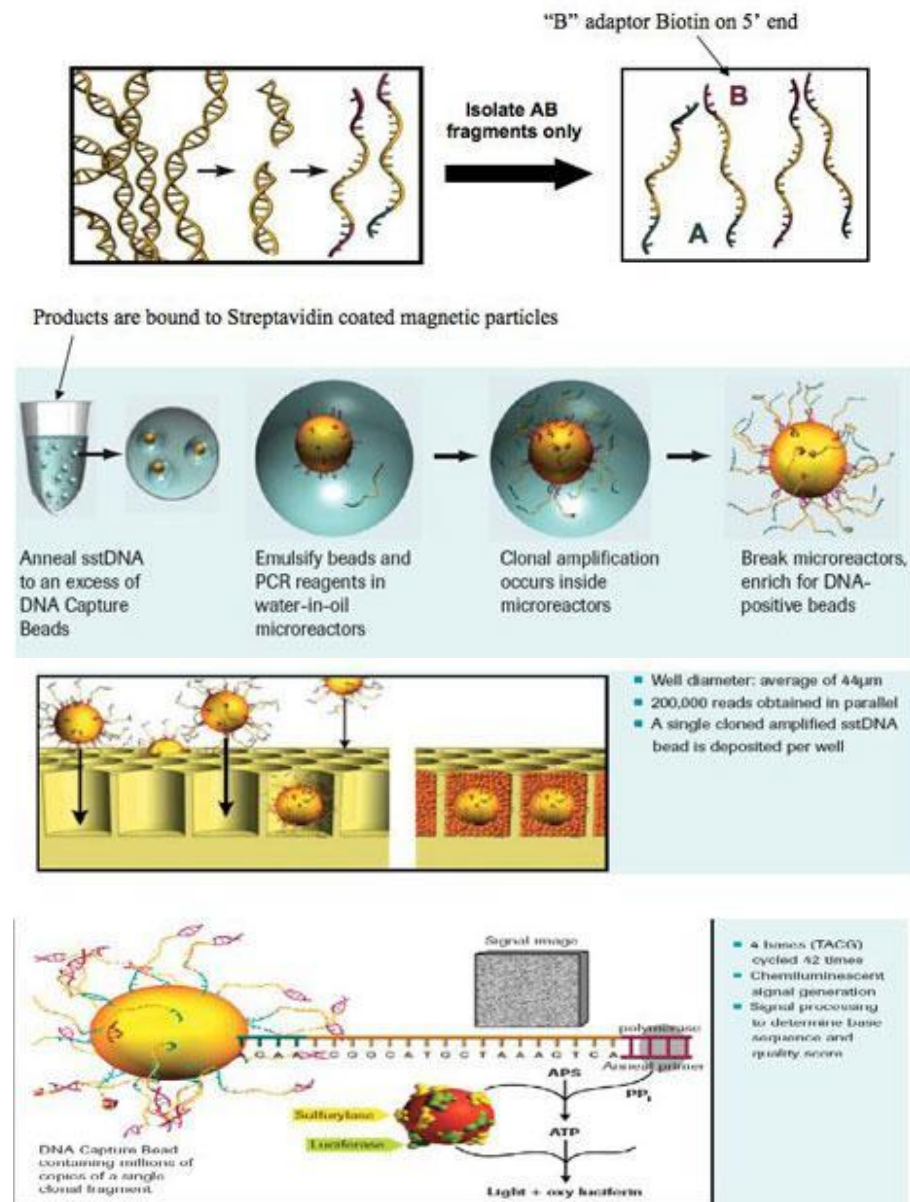
Клональная амплификация секвенируемых фрагментов в методах NGS



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.

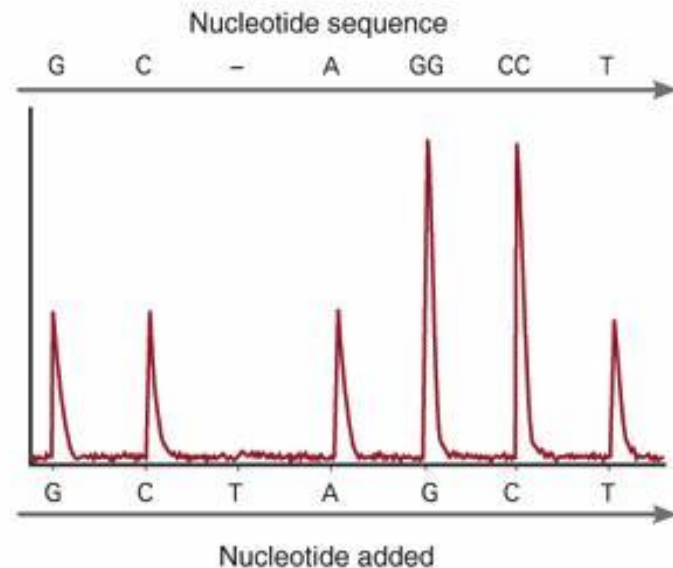
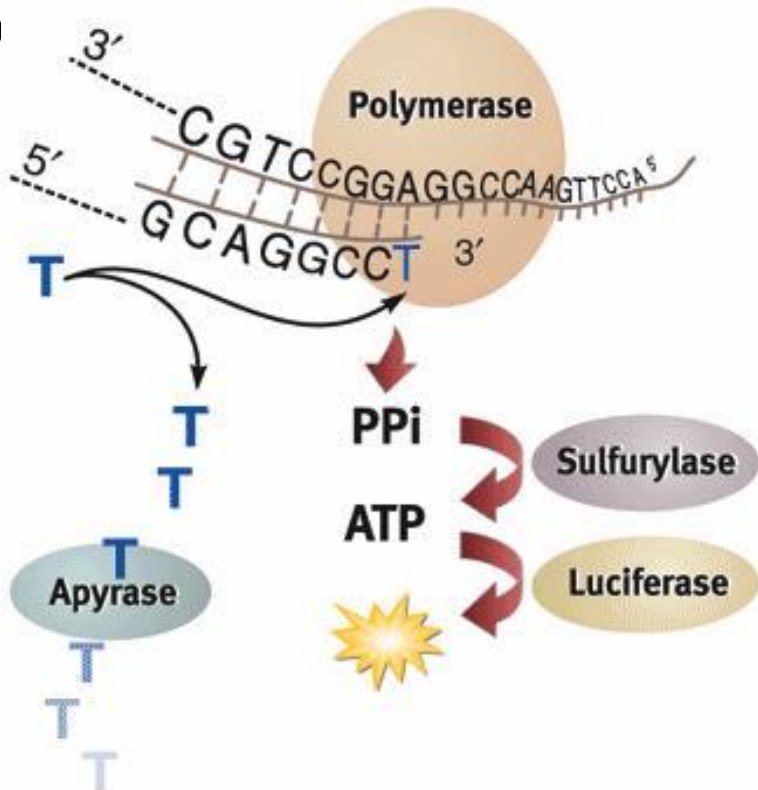
- 1. ДНК фрагментируется, к фрагментам пришиваются олигонуклеотиды-«адаптеры»; фрагменты ДНК разделяются на 2 комплементарные цепи.
- 2. к каждой бусинке прикрепляются по 1 одноцепочечной ДНК. Отдельные бусинки заключаются в капли реакционной смеси, окруженные маслом. В результате эмульсионной ПЦР количество 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.



Пиросеквенирование

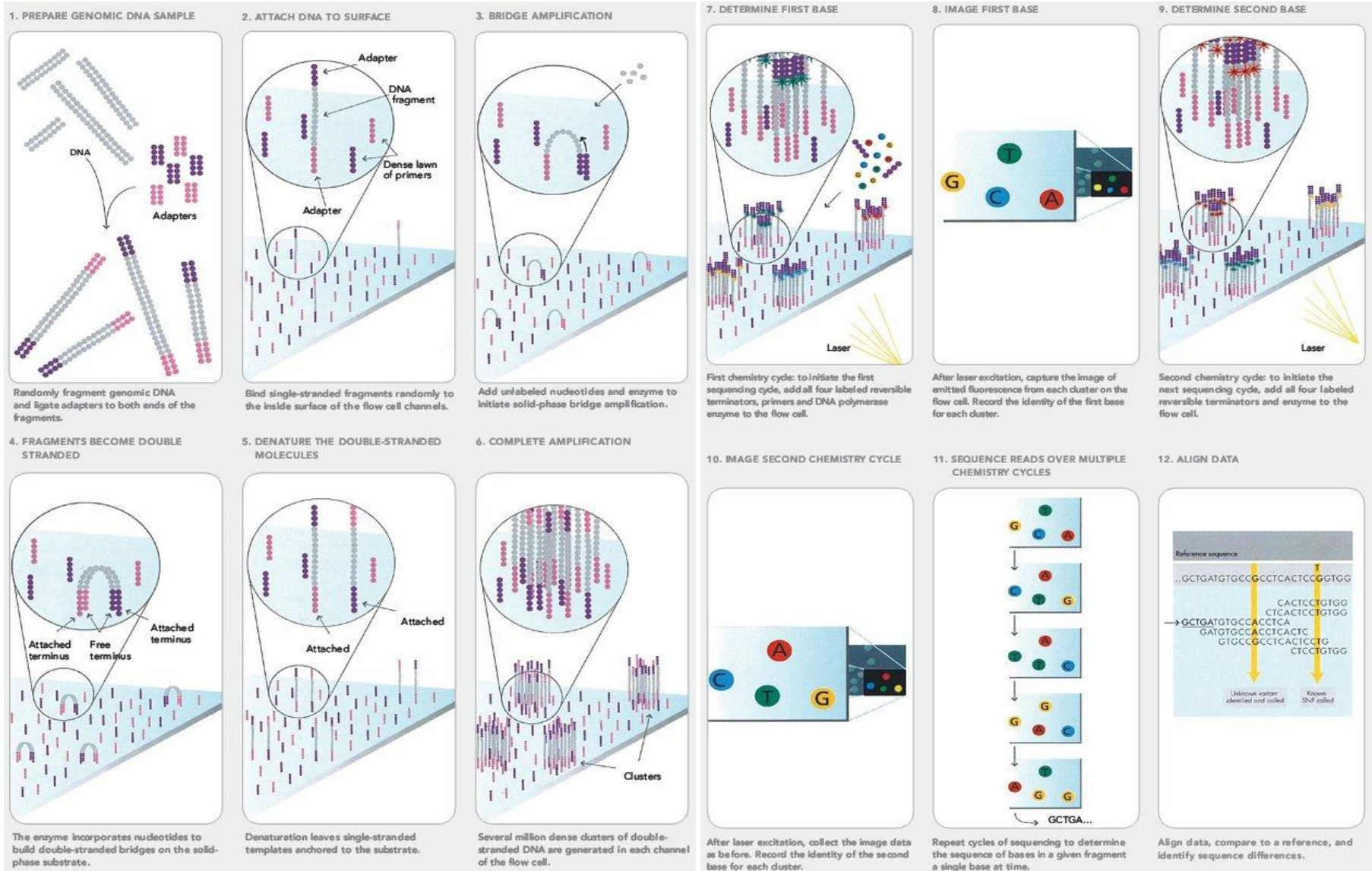
Метод пиросеквенирования основан на определении пирофосфата, образующегося при синтезе комплементарной цепи ДНК. В 1988 г. Е.Нуман впервые предложил использовать этот метод для секвенирования. В 1996 г. Р.Нyrén и М.Рonaghi завершили детальную разработку данного метода.

<http://>



Секвенирование на молекулярных кластерах с использованием флуоресцентно меченных предшественников.

Illumina



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.

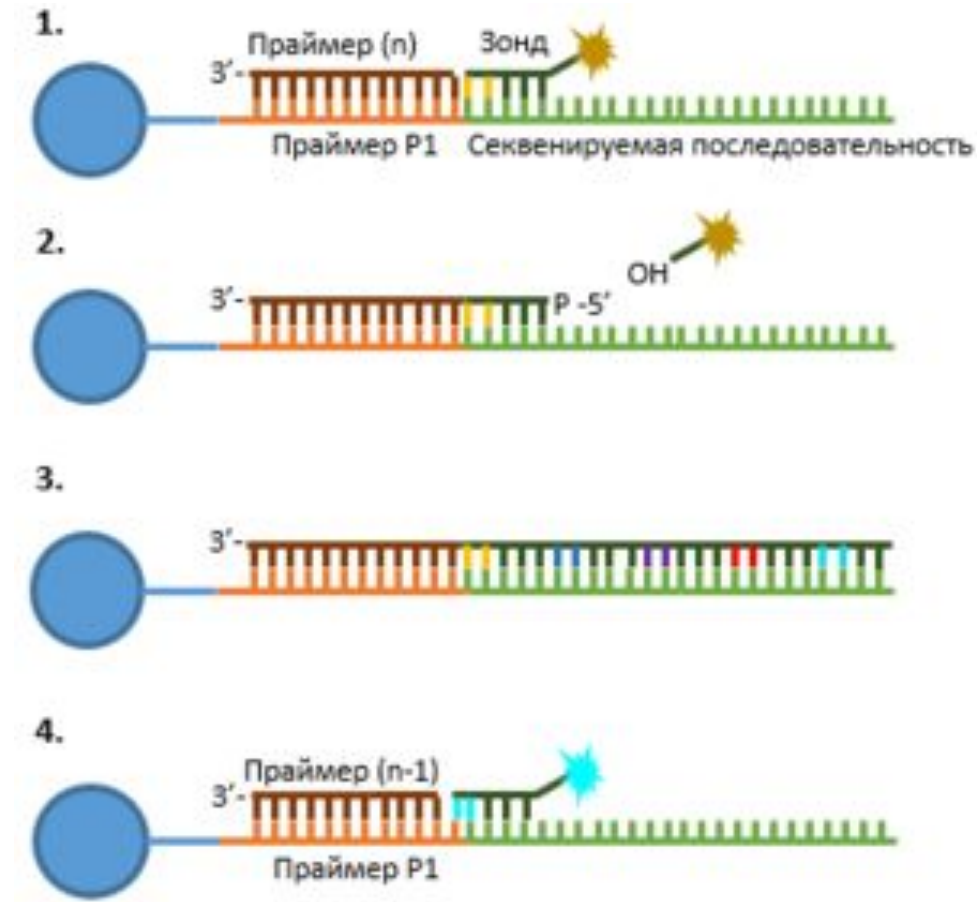
SOLiD

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

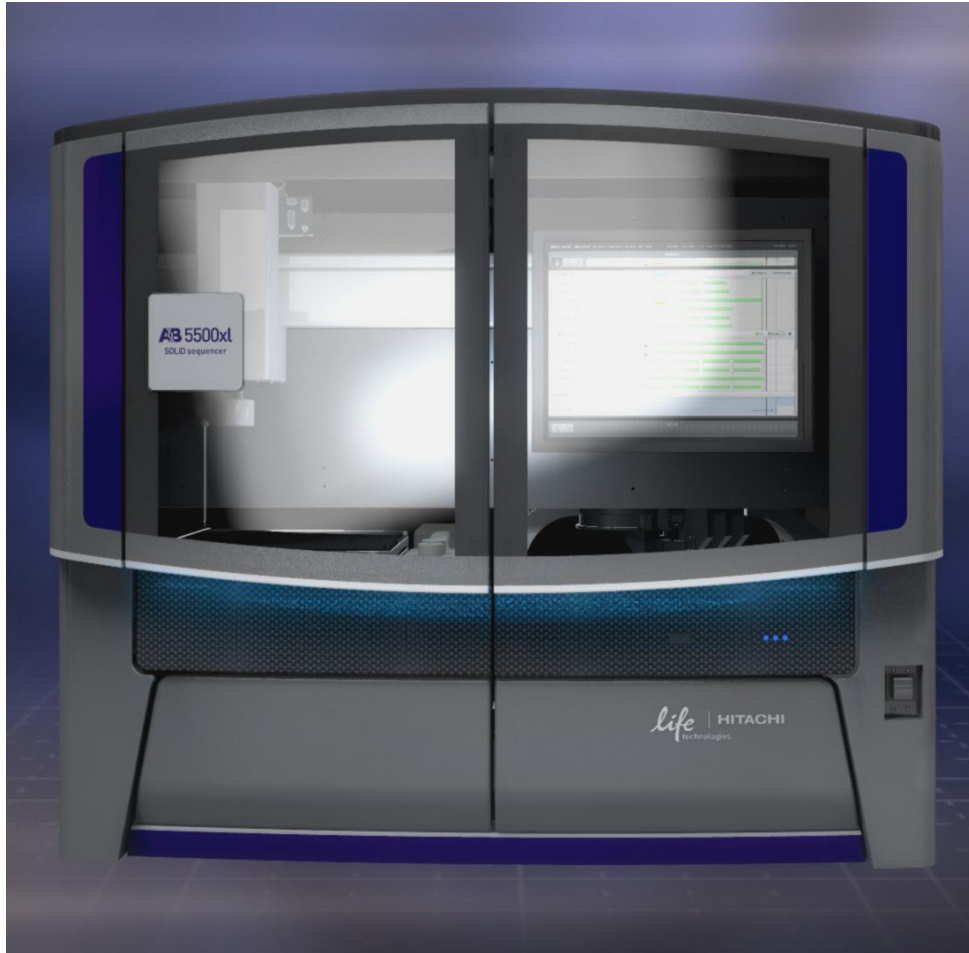
(2) Разрезание зонда, освобождение от метки.

(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 %

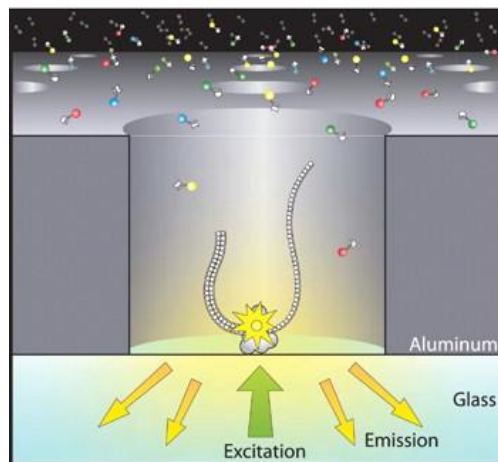
Сравнительная характеристика NGS и NNGS секвенаторов (январь 2014 г.)

Характеризуемый показатель	Модели секвенаторов							
	NGS							NNGS
	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

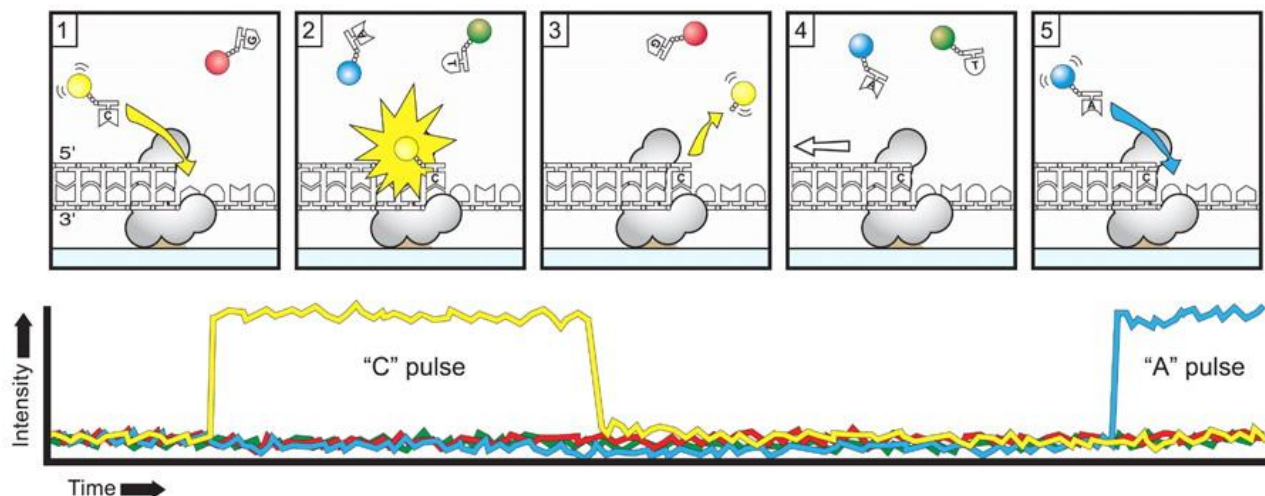
Секвенирование единичных молекул в реальном времени.

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



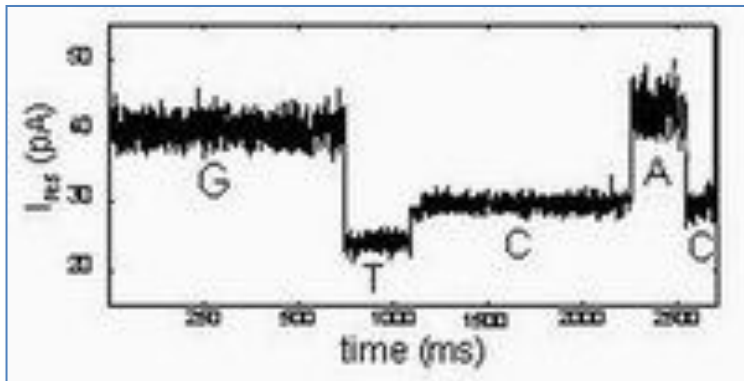
Секвенирование единичных молекул в реальном времени.



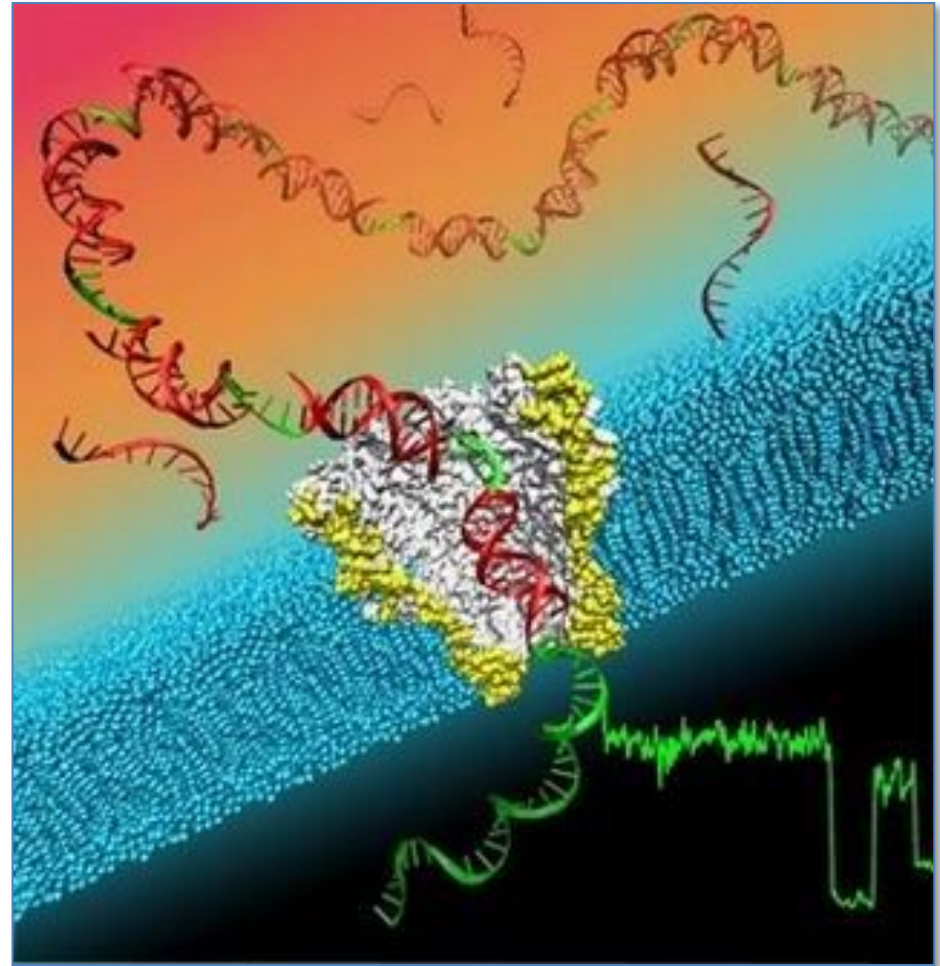
Прибор «PacBio RS», основанный на этой технологии, имеет высокую собственную стоимость, но в то же время экспрессную пробоподготовку, высокую скорость и низкую стоимость секвенирования ДНК

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.