



LÉKAŘSKÁ FAKULTA MASARYKOVY UNIVERSITY
Interní hematoonkologická klinika LF MU a FN Brno
Centrum molekulární biologie a genové terapie



Moderní metody analýzy genomu

Masivně paralelní sekvenování I

17.3. 2011

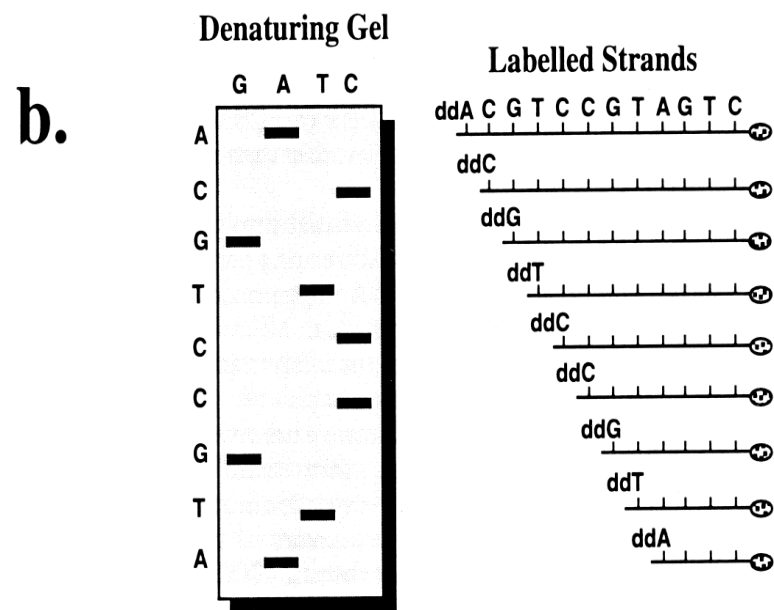
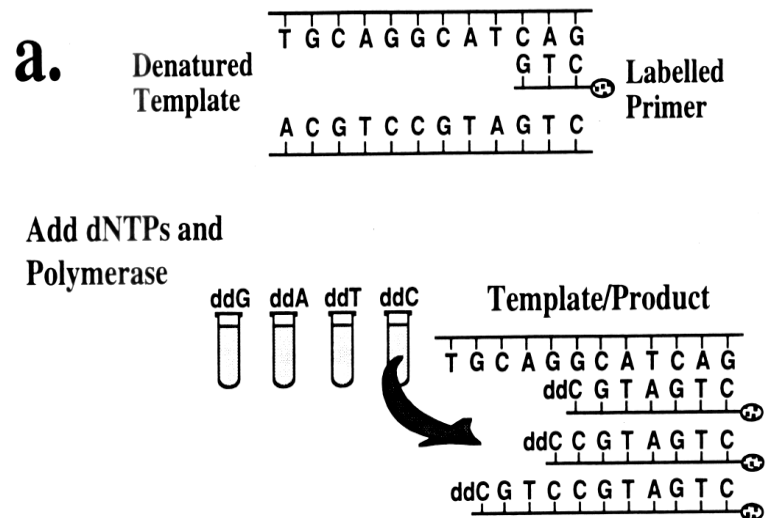
Boris Tichý



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

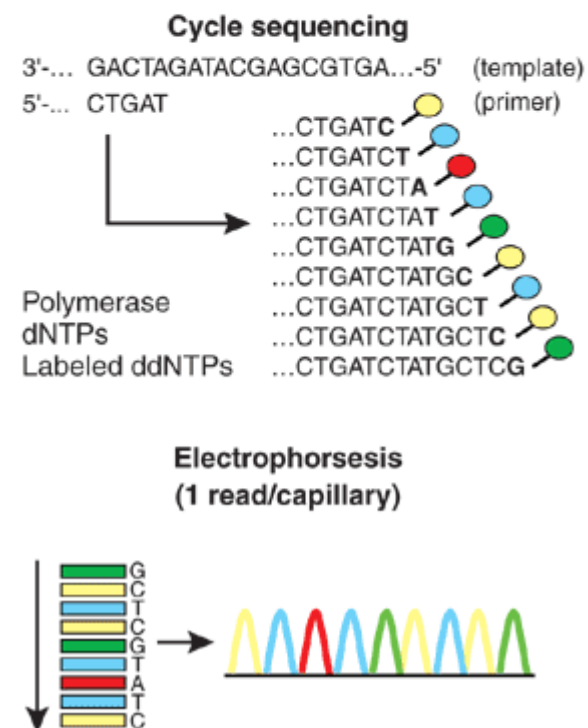
Sekven(c)ování



Gel → kapilární elektroforéza

Dideoxy-NTPs → ukončení polymerace

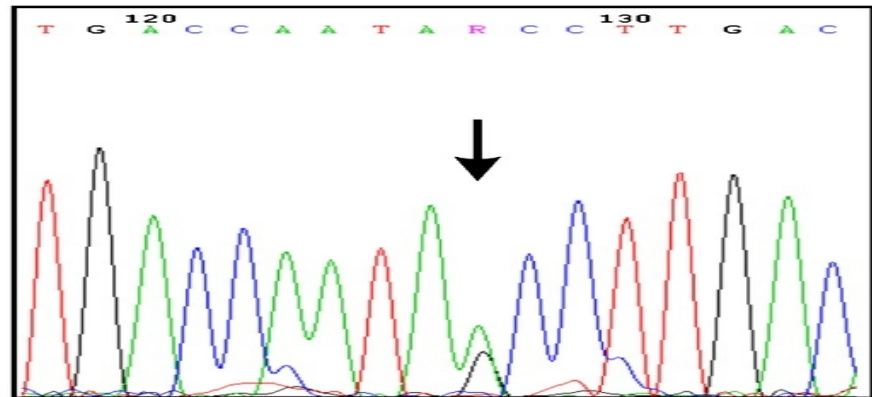
Značené primery nebo ddNTPs



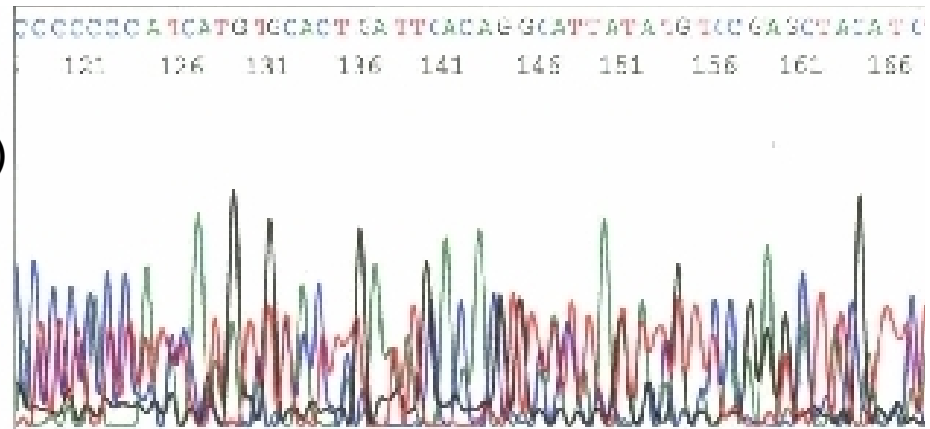
Sekven(c)ování

Analyzuje směs DNA fragmentů

Heterozygotní mutace (1:1) →



Směs fragmentů
(např. nespecifická PCR amplifikace)



Jednotlivé fragmenty (jednotlivé alely z jednotlivých buněk)
→ klonování a sekvenování

Masivně paralelní sekvenování

PCR amplifikace jednotlivých DNA fragmentů a sekvenování

nebo

Sekvenování jednotlivých DNA fragmentů

= Single molecule sequencing

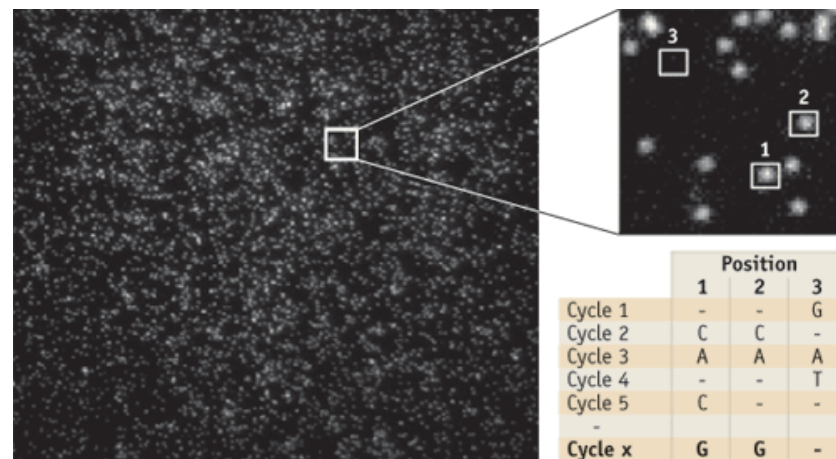
Technologie a přístroje přizpůsobeny paralelizaci

Stovky milionů jednotlivých PCR reakcí a sekvenací najednou

(běžně prodávané kapilární sekvenátory jsou max. 96-kapilární)

Většinou kratší sekvence – desítky bazí

(kapilární – běžně až 1000 bazí)

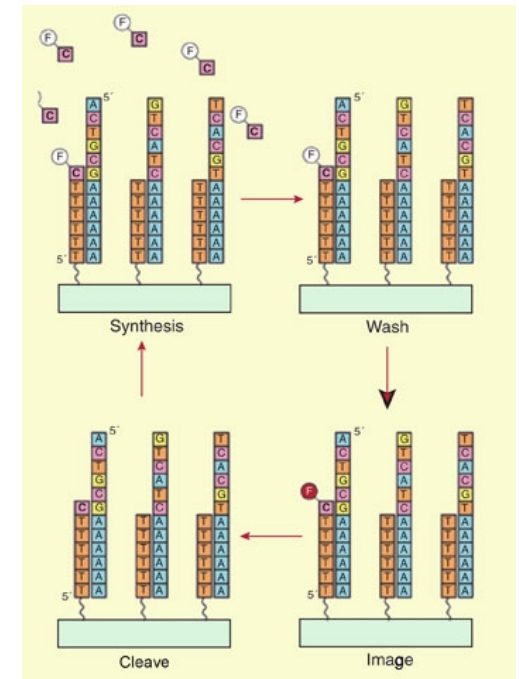


Masivně paralelní sekvenování

Sequencing by synthesis

Polymeráza

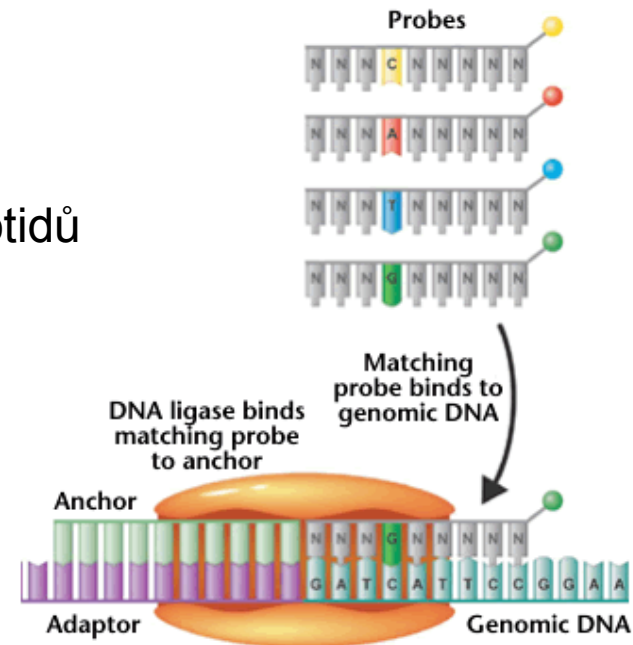
Sestavování nového řetězce z jednotlivých nukleotidů



Sequencing by ligation

Ligáza

Sestavování nového řetězce z oligonukleotidů



Masivně paralelní sekvenování

Technologie Roche/454

První na trhu

Emulzní PCR + pyrosekvenování

Picotiter plate

Sekvenační reakce ve vlastních
(mikro)jamkách

Dlouhé fragmenty, malá kapacita

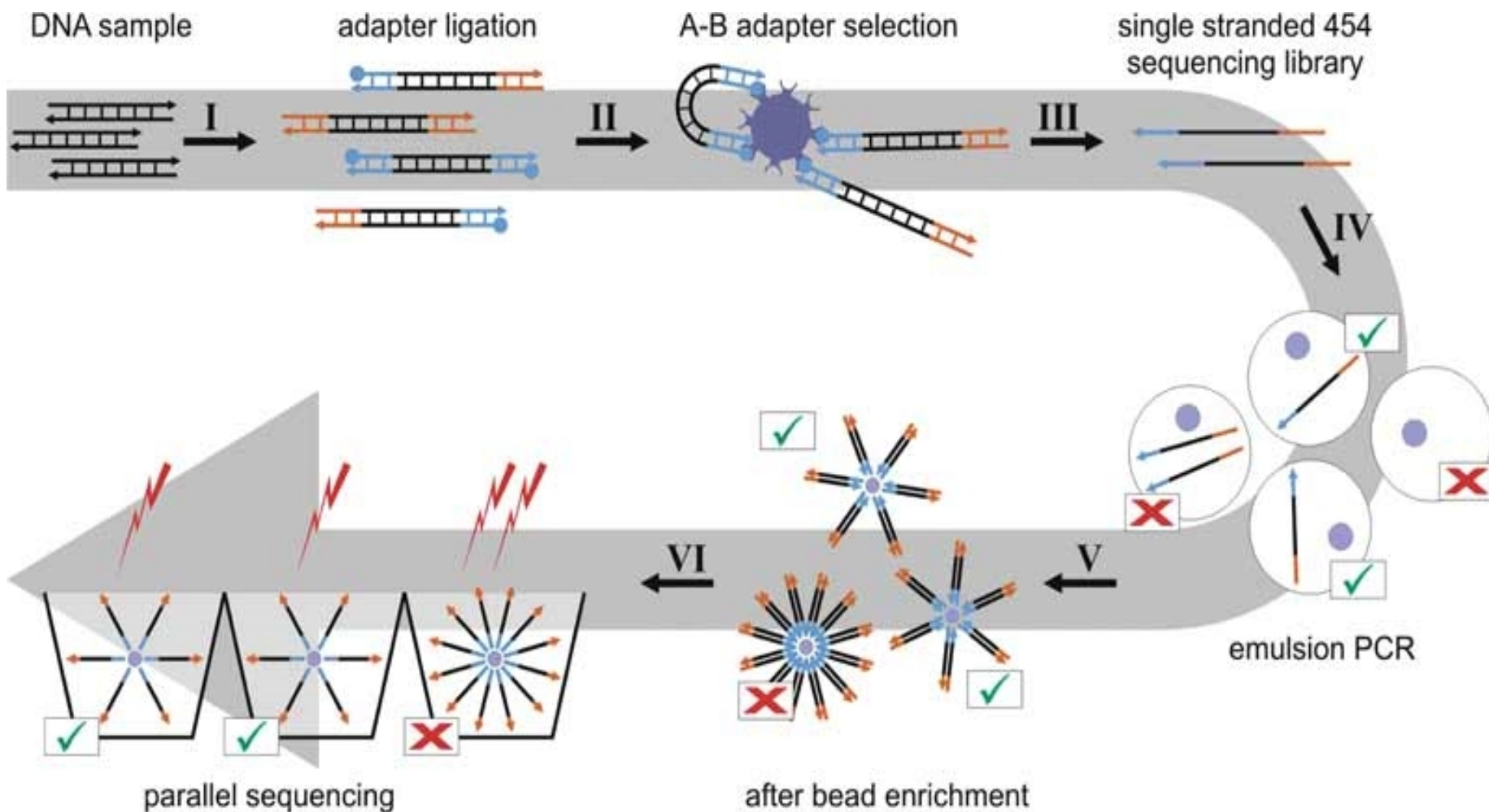
Chemie

Nemodifikované nukleotidy

Jeden typ nukleotidu/cyklus



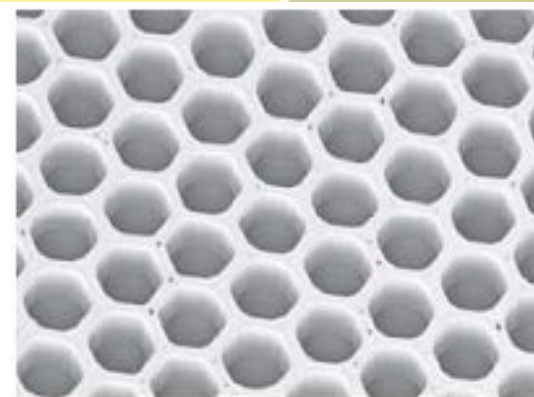
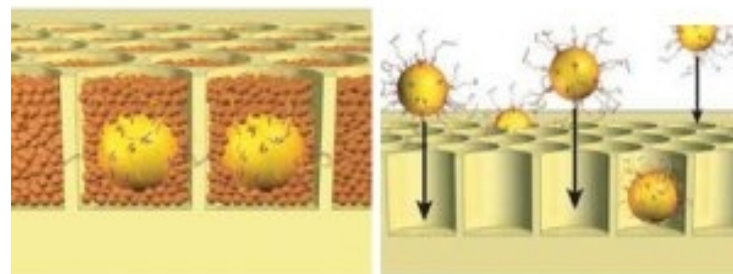
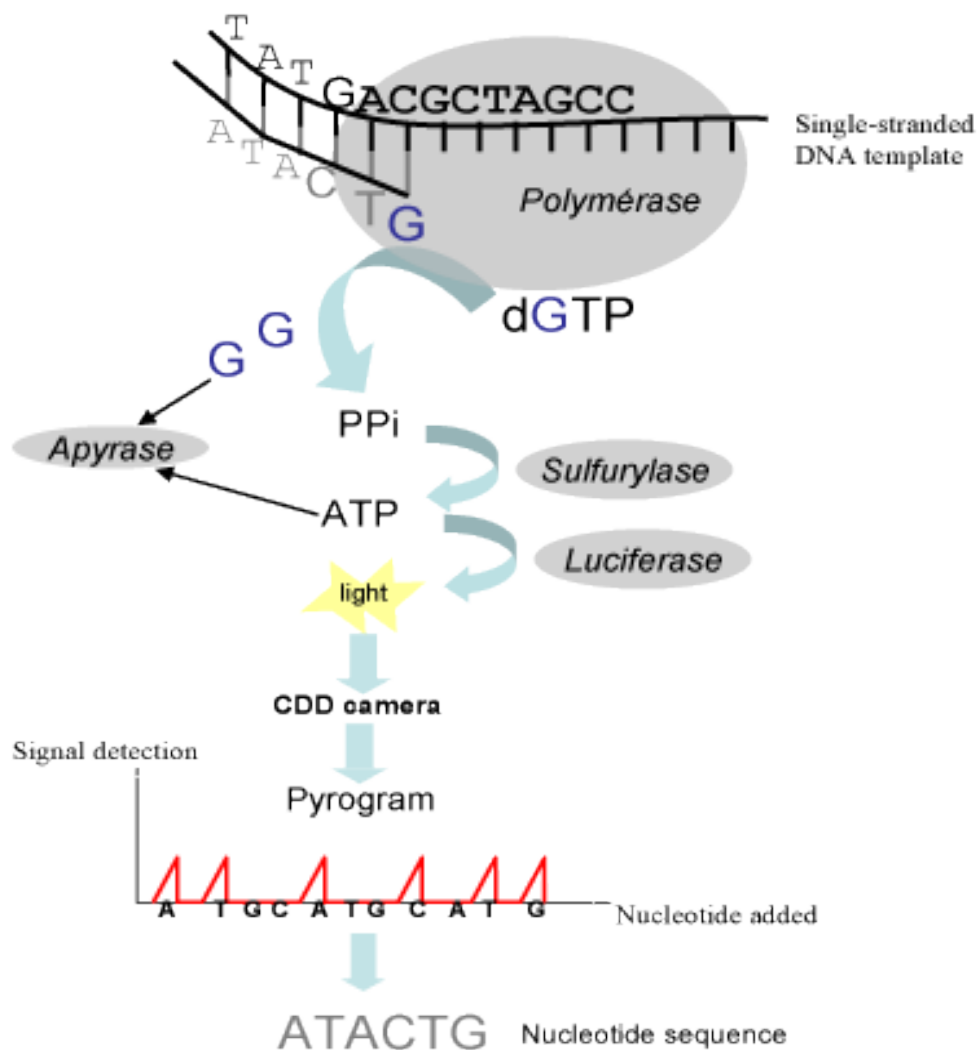
Emulzní PCR



Masivně paralelní sekvenování

Technologie Roche/454

Pyrosekvenování



Masivně paralelní sekvenování

Technologie Roche/454

Výhody

Dlouhé sekvence

Diagnostika - Roche

Nevýhody

Chybovost - homopolymerní úseky

Cena/kapacita

Pracnost

Standardizace

Malá kapacita – analýzy exprese RNA obtížné

Dostupné přístroje

Genome Sequencer FLX

GS Junior



Masivně paralelní sekvenování

Technologie Ion Torrent

Emulzní PCR

Monitorování H^+ uvolněných při inkorporaci nukleotidu

Speciální čipy

Sekvenační reakce ve vlastních (mikro)jamkách, dno tvoří polovodičová elektroda citlivá na pH

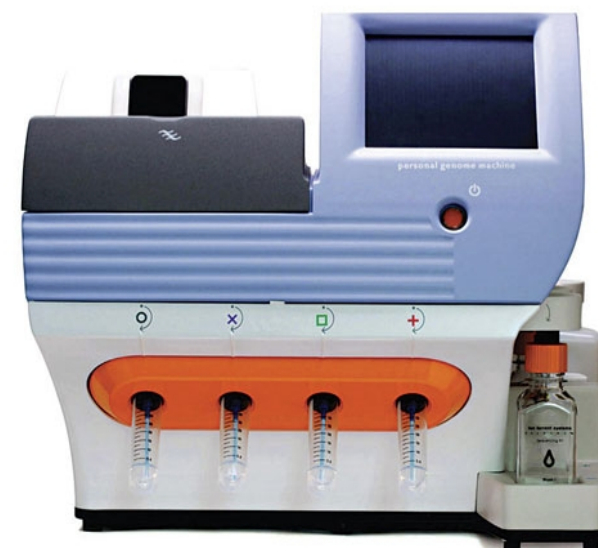
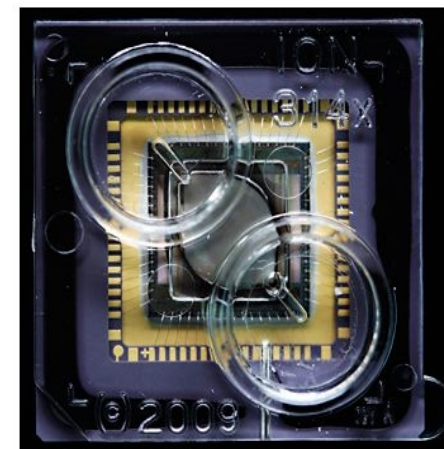
Malá kapacita, zatím kratší fragmenty (100+)

Nízká cena

Chemie

Nemodifikované nukleotidy

Jeden typ nukleotidu/cyklus



Masivně paralelní sekvenování

Technologie Ion Torrent

