



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 III

25.11. 2011

Boris Tichý

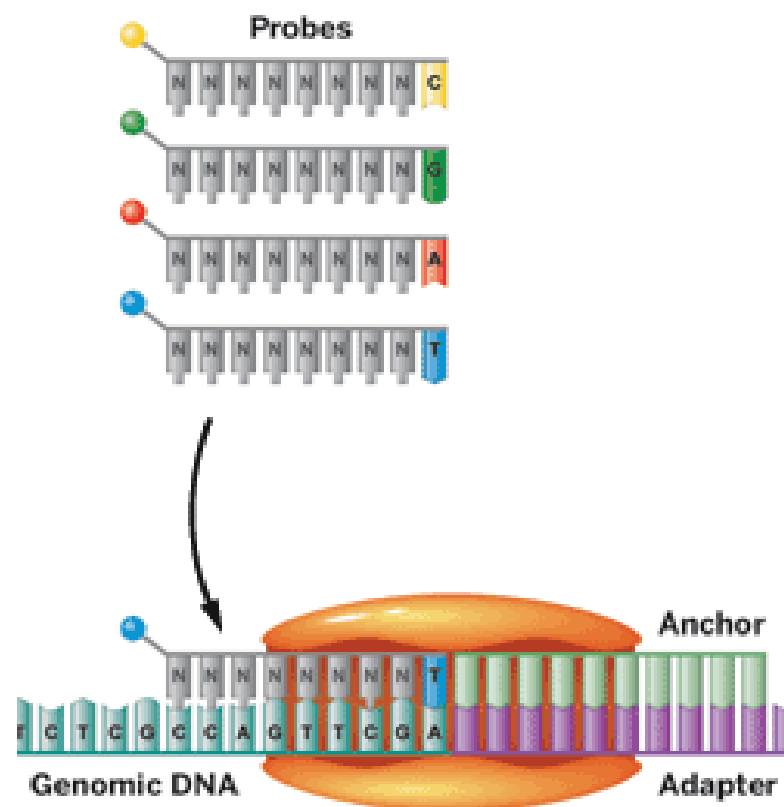
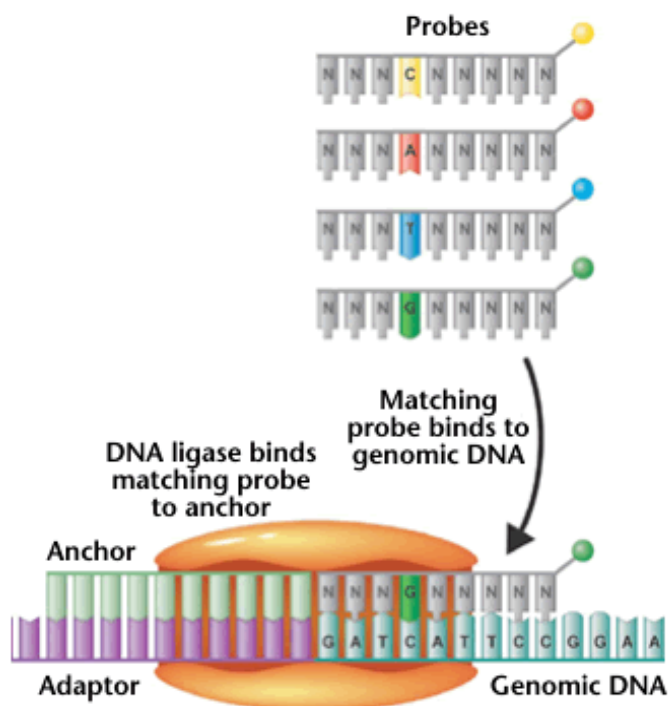


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Masivně paralelní sekvenování

Sekvenování (hybridizací a) ligací



Masivně paralelní sekvenování

Technologie SOLiD (Life Technologies (Applied Biosystems))

emPCR

Sekvenování ligací

Velká kapacita, krátké fragmenty (75)

Silné zázemí, nízká cena za bázi

Dvoubázové kódování, řetězení ligací

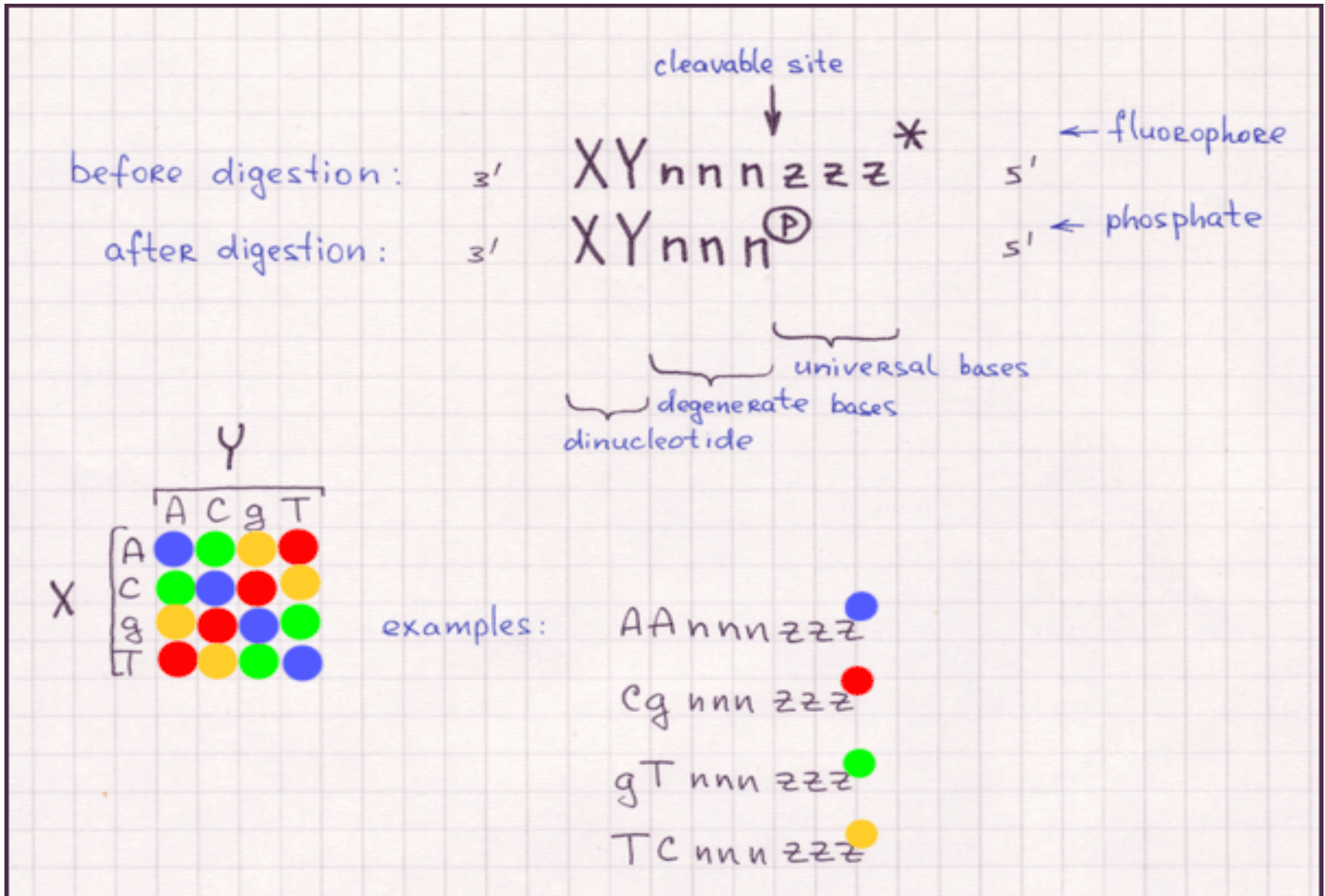
Chemie

Fluorescenčně značené oligonukleotidy (4 barvy)

Pool všech oligonukleotidů/cyklus

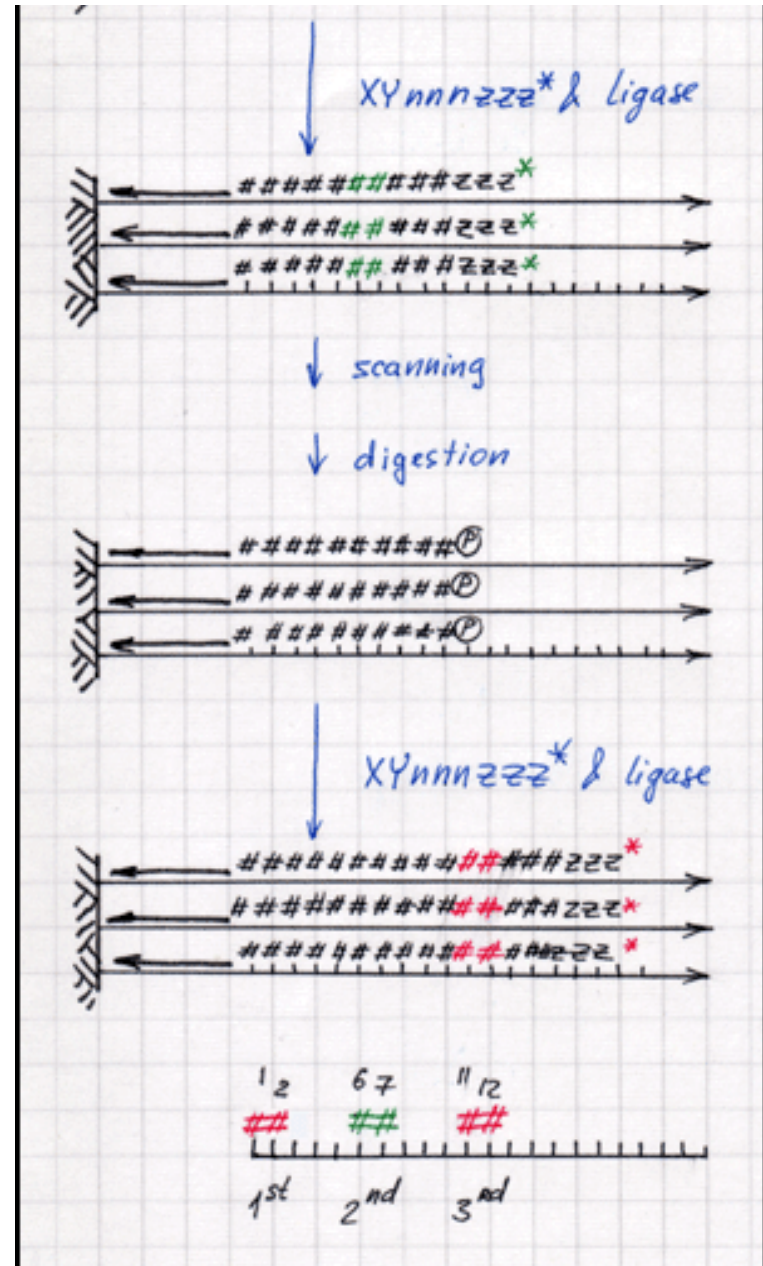
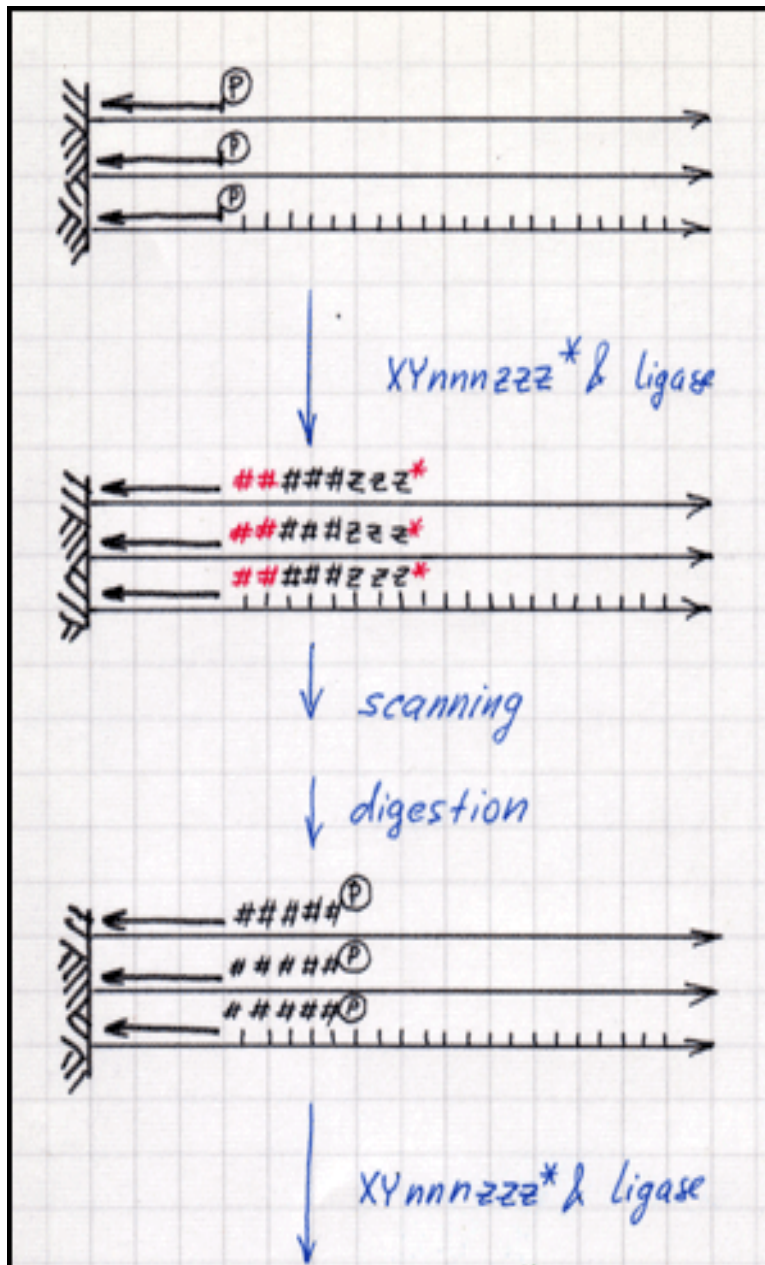
Masivně paralelní sekvenování

Technologie SOLiD



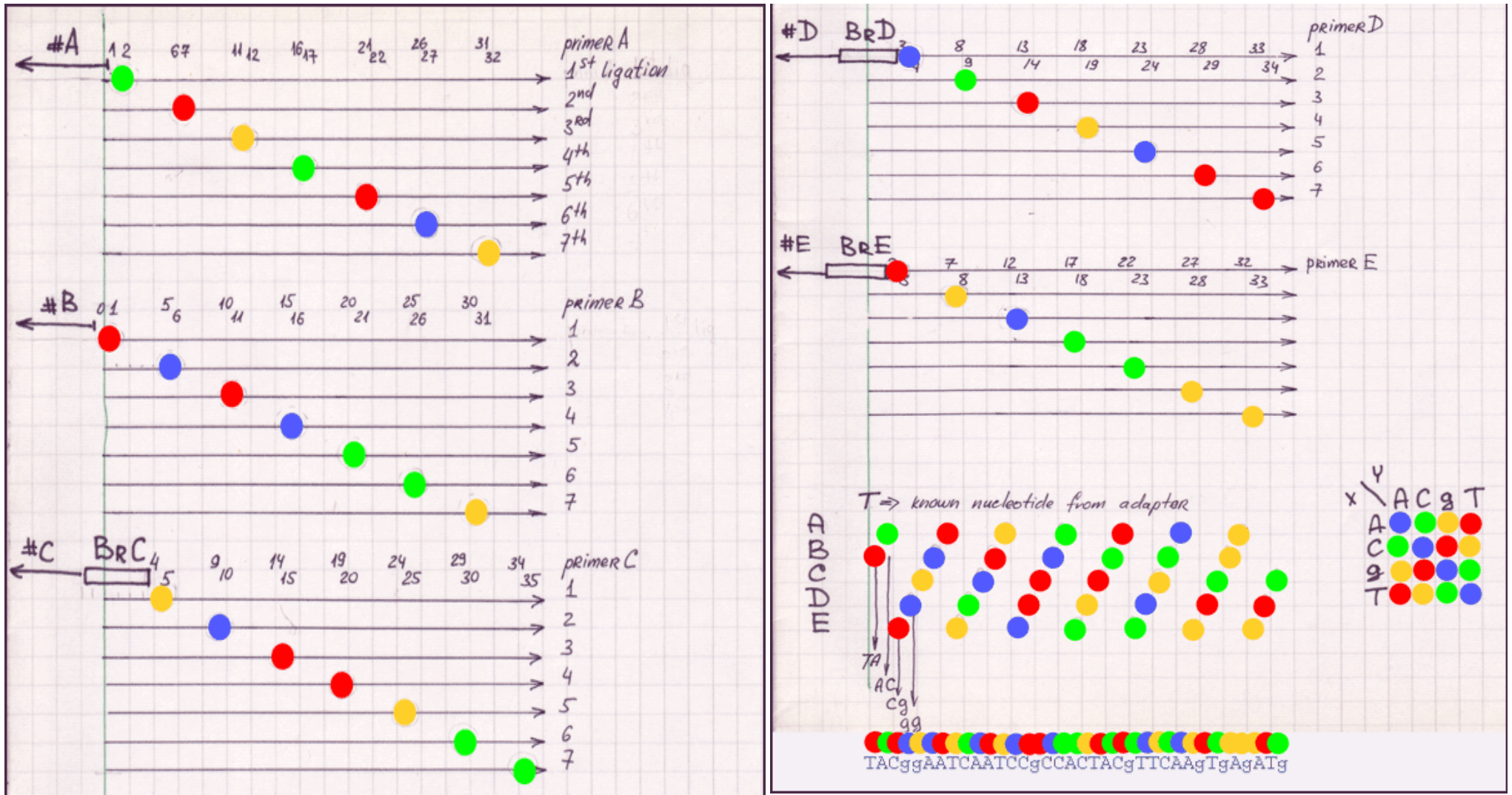
Masivně paralelní sekvenování

Technologie SOLiD



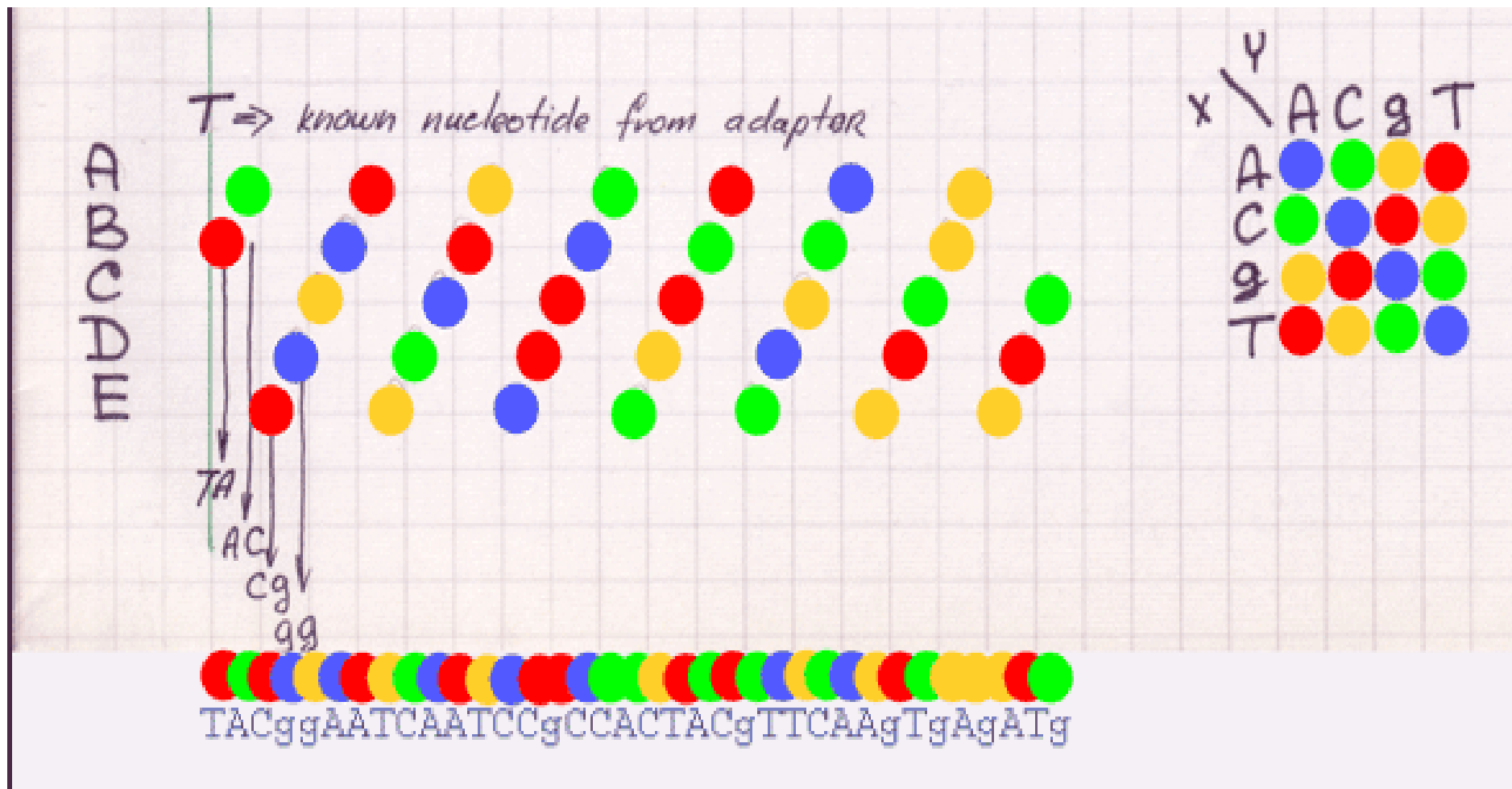
Masivně paralelní sekvenování

Technologie SOLiD



Masivně paralelní sekvenování

Technologie SOLiD



Masivně paralelní sekvenování

Technologie SOLiD

Výhody

Velká kapacita (desítky Gb)

Automatizace ?

Rozšíření

Množství aplikací

Cena za bázi

Přesnost ?

Nevýhody

Rychlost (1 běh až 10 dní)

(Cena)

Dostupné přístroje

5500 xL

5500

SOLiD 3

SOLiD 4

Masivně paralelní sekvenování

Technologie Polonator

emPCR

Sekvenování ligací

(zatím) krátké fragmenty (26 ← 2x 13)

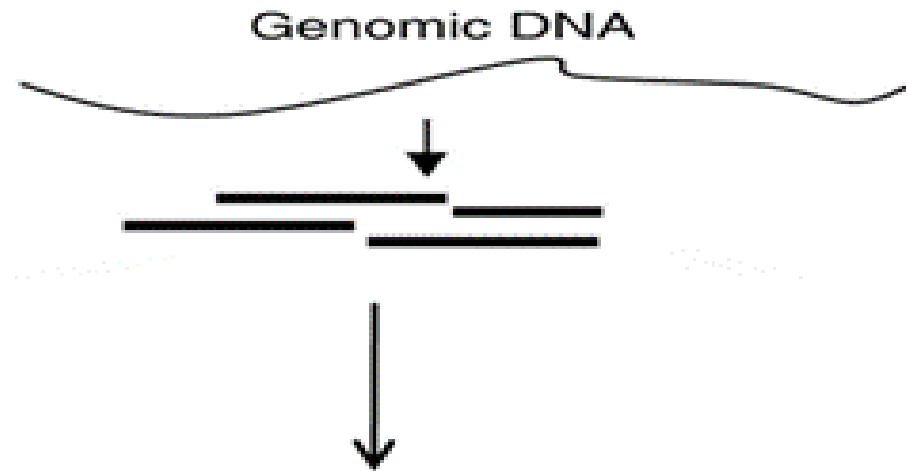
Otevřená technologie

Kapacita až několik Gb

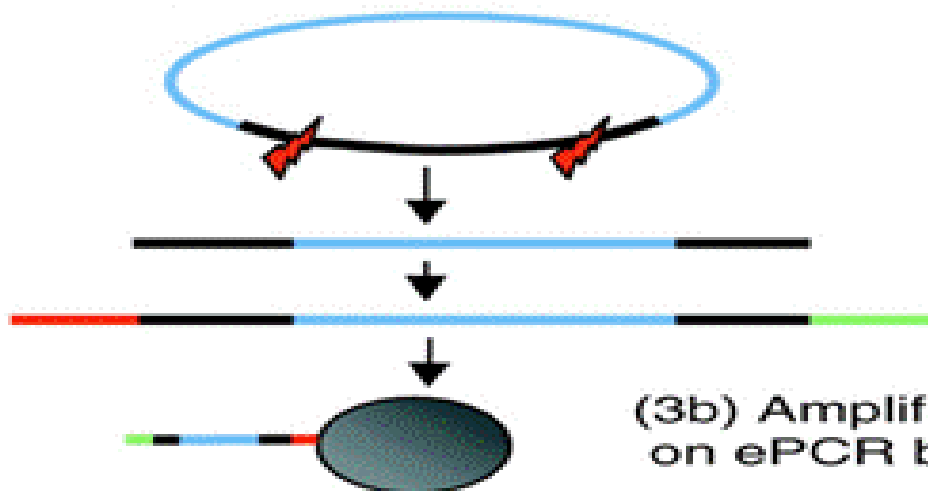
Chemie

Fluorescenčně značené oligonukleotidy (4 barvy)

Pool nukleotidů/cyklus

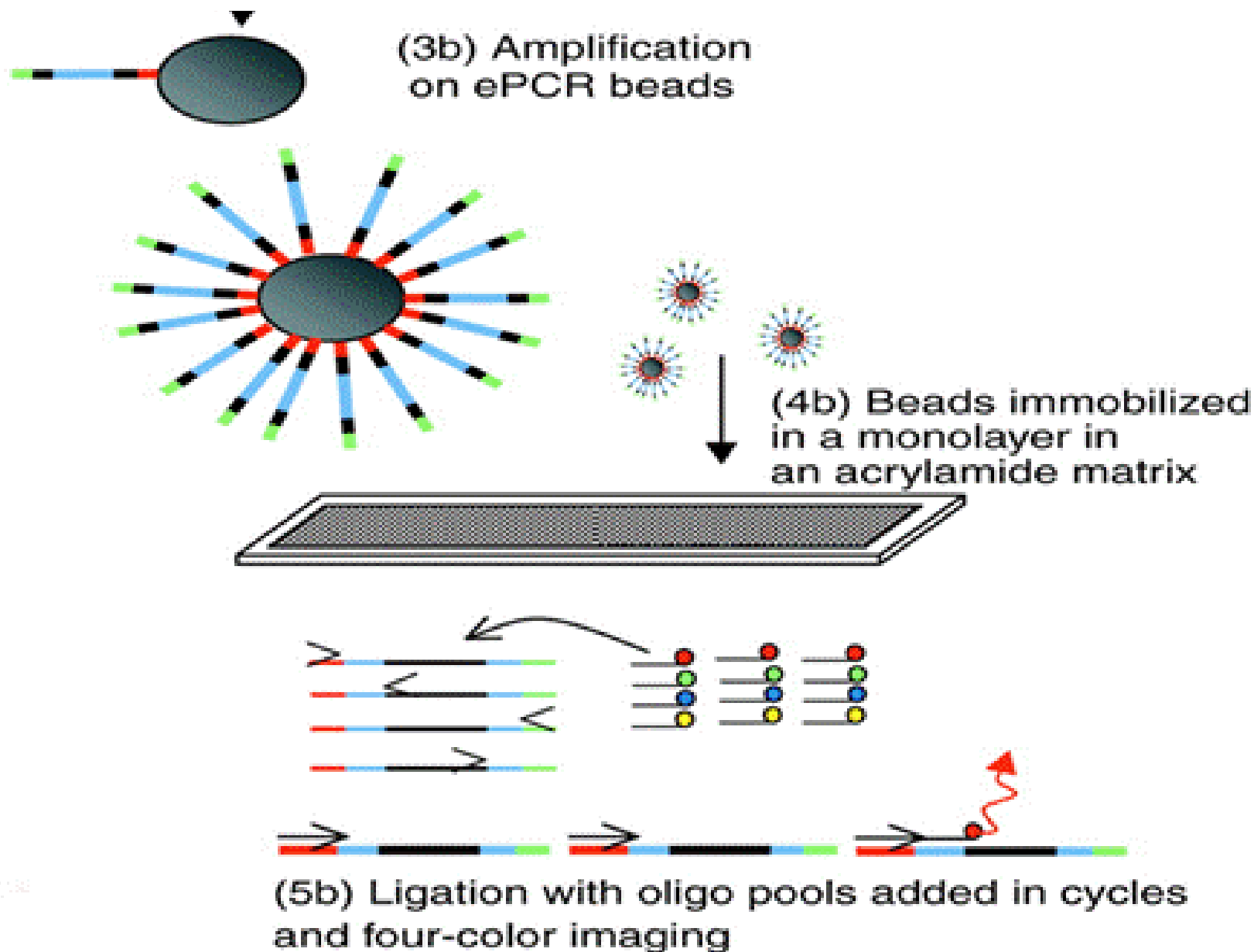


(1) Sheering to small fragments



(2b) Circularization
and linker attachment

(3b) Amplification
on ePCR beads



Masivně paralelní sekvenování

Výhody

Otevřená technologie

Pořizovací cena (\$170k)

Cena za bázi ?

Nevýhody

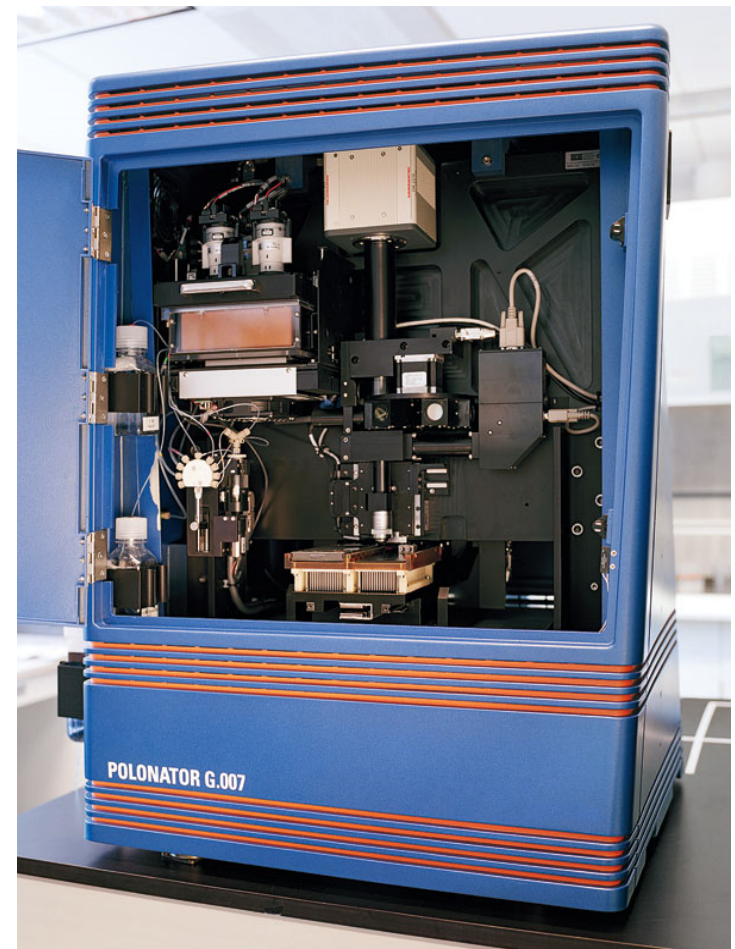
Velmi krátké sekvence (7-8 nukleotidů)

Rozšíření ?

Technologie Polonator

Dostupné přístroje

G.007



Masivně paralelní sekvenování

Technologie cPAL (Complete Genomics)

Rolling circle amplification (RCA)

Sekvenování ligací

“DNA nanoballs” uspořádané do mřížky na sklíčku

(zatím) krátké fragmenty (2x 35)

Pouze služba – **Complete Genomics**

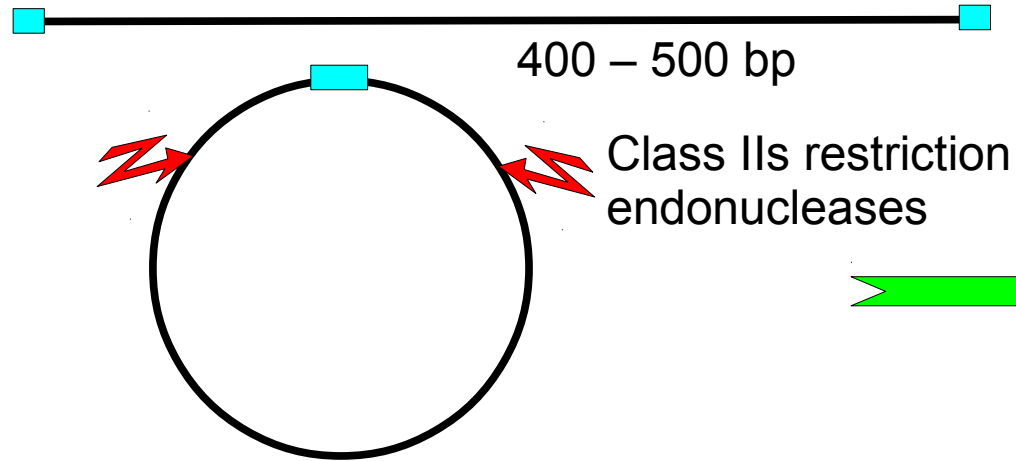
Velmi nízká cena (< \$2000/lidský genom)

Chemie

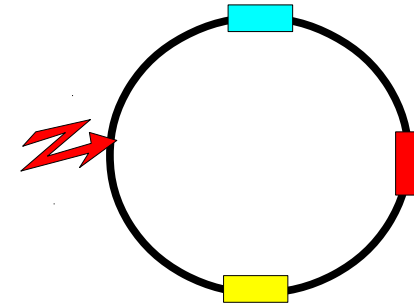
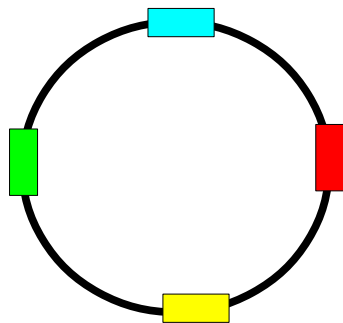
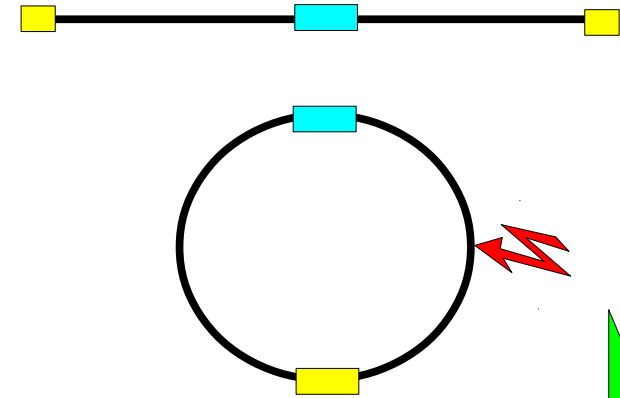
Fluorescenčně značené oligonukleotidy (4 barvy)

Pool oligonukleotidů/cyklus

Masivně paralelní sekvenování

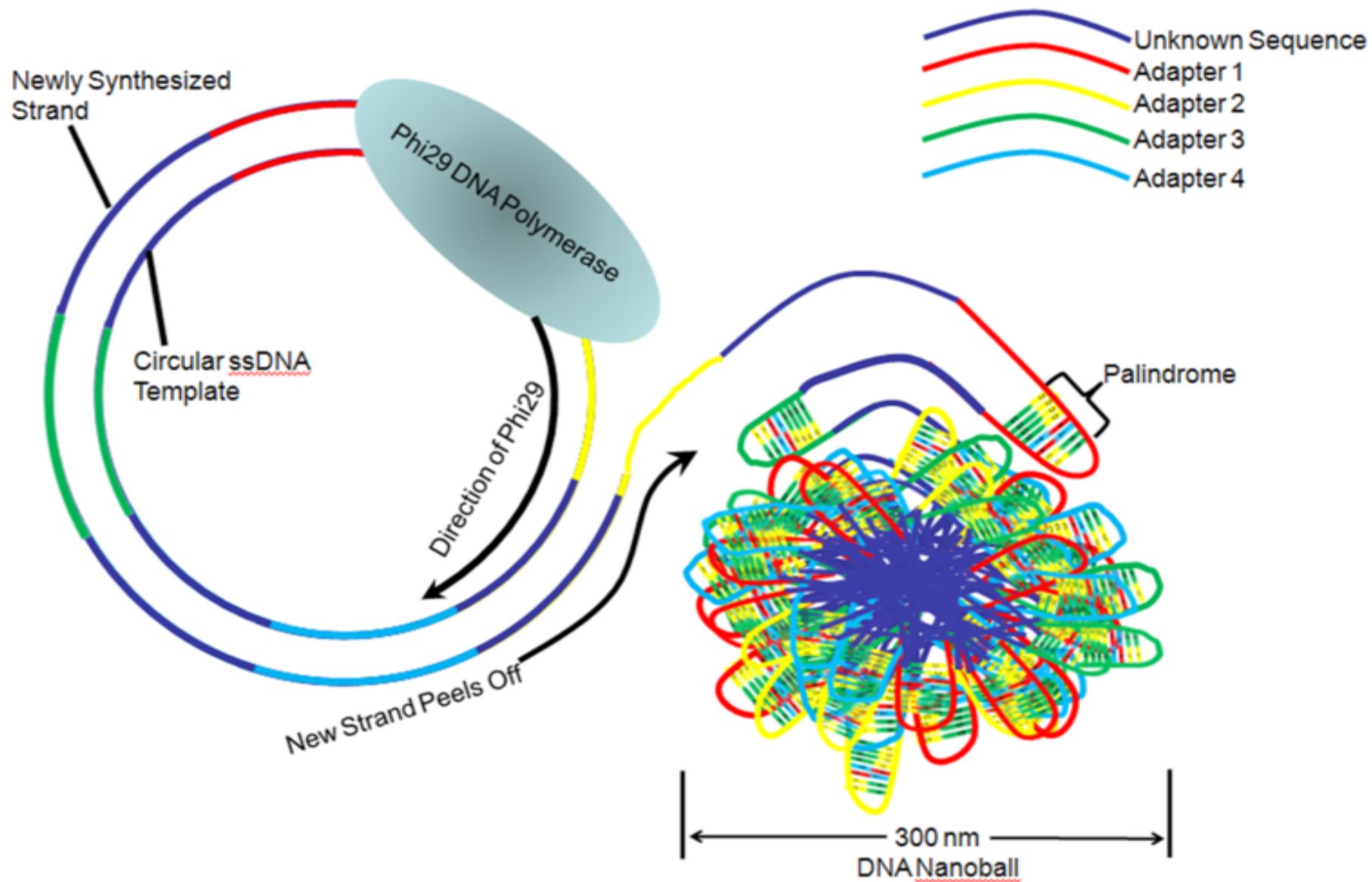


Technologie cPAL



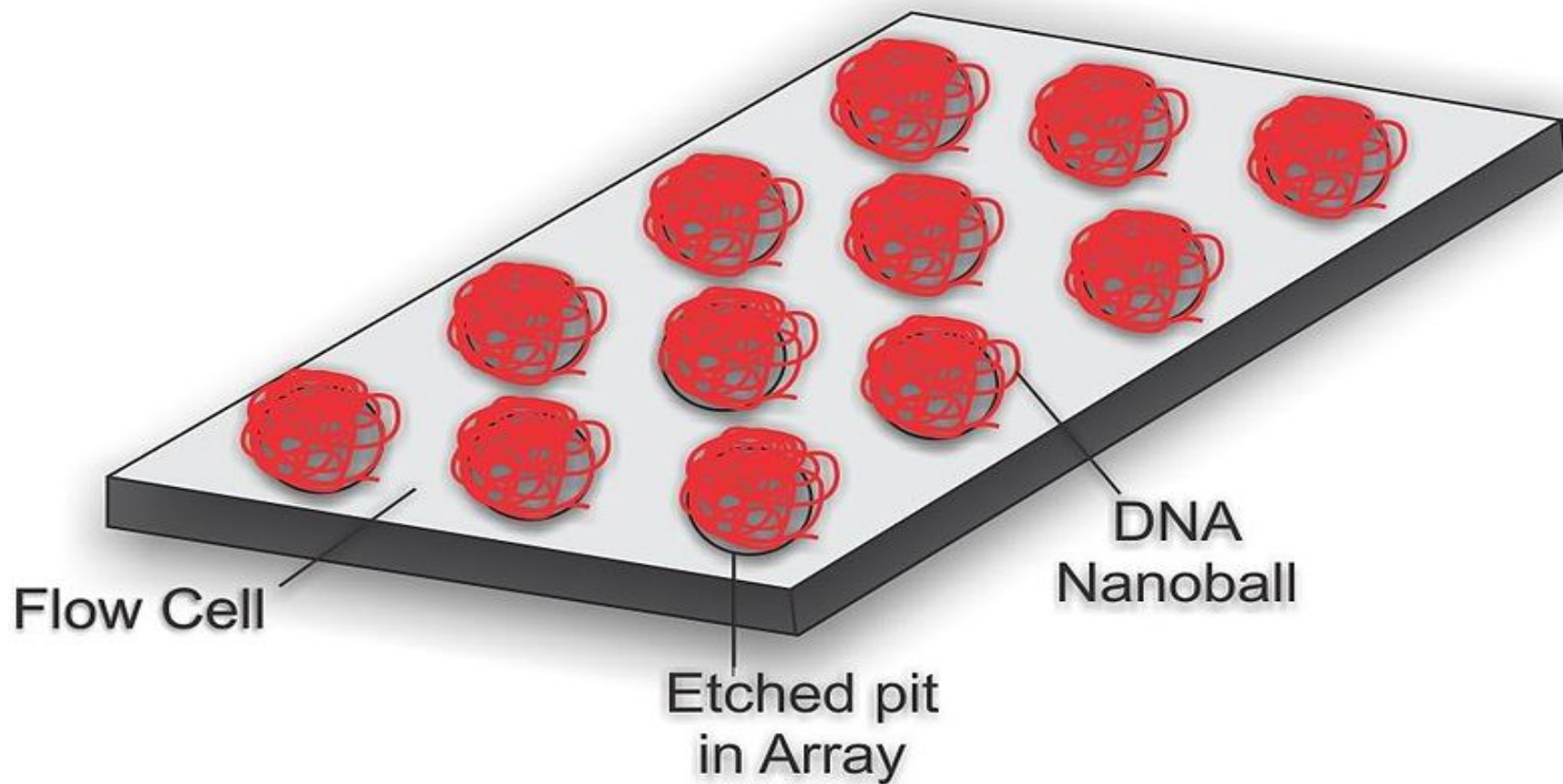
Masivně paralelní sekvenování

Technologie cPAL



Masivně paralelní sekvenování

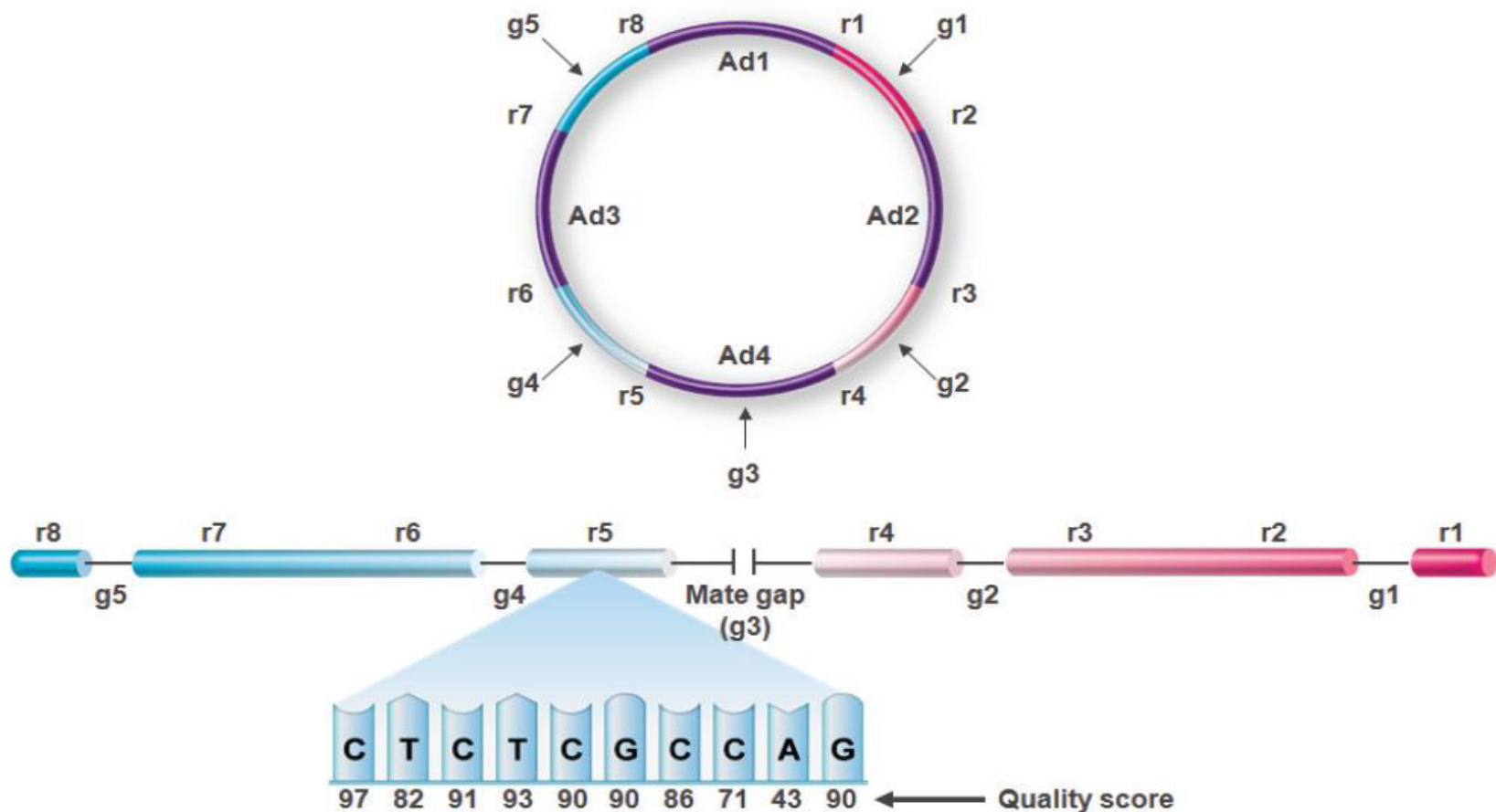
Technologie cPAL



> 2,5 miliardy jamek na ploše velikosti podložního sklíčka (rozestup 0,7 mikrometru)

Masivně paralelní sekvenování

Technologie cPAL



Sekvenování - 10 bází na obě strany od každého adaptoru

Masivně paralelní sekvenování

Výhody

Nízká cena

Nevýhody

Pouze služba

Krátké fragmenty

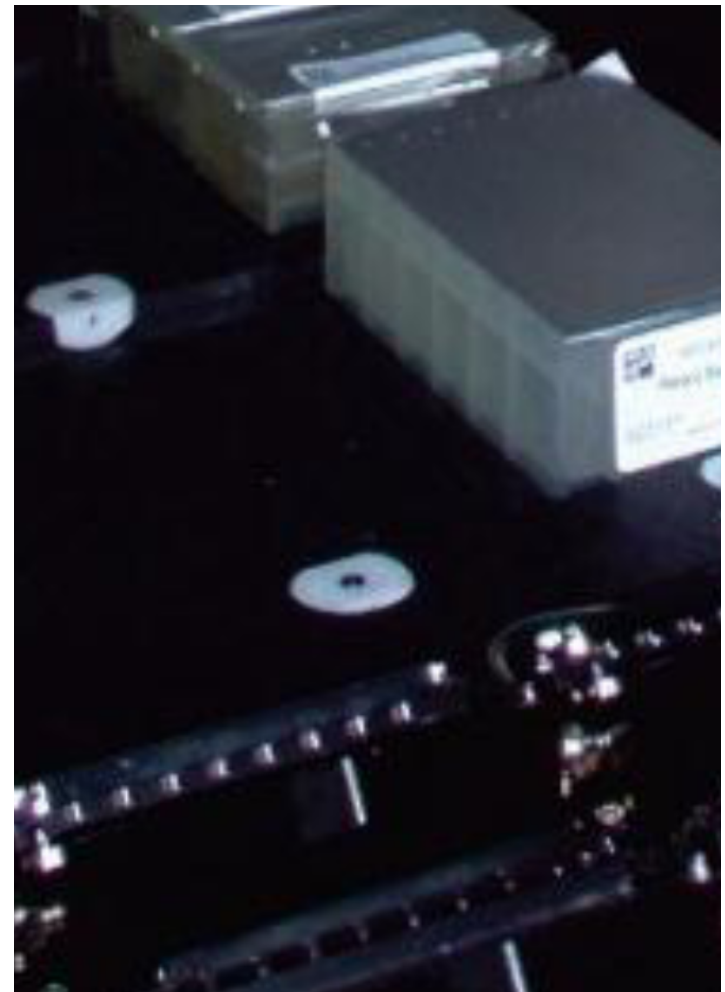
Spektrum aplikací



Technologie cPAL

Dostupné přístroje

Pouze služba



Masivně paralelní sekvenování

Technologie SMRT (Pacific Biosciences)

Single Molecule Real Time

Sekvenování syntézou

ZMW – Zero Mode Wavelength – velmi malé reakční jamky

I velmi dlouhé fragmenty – až několik kb

Opakované čtení stejné molekuly – Circular consensus sequencing

4tení pouze částí velmi dlouhých fragmentů – strobe sequencing

Krátce na trhu

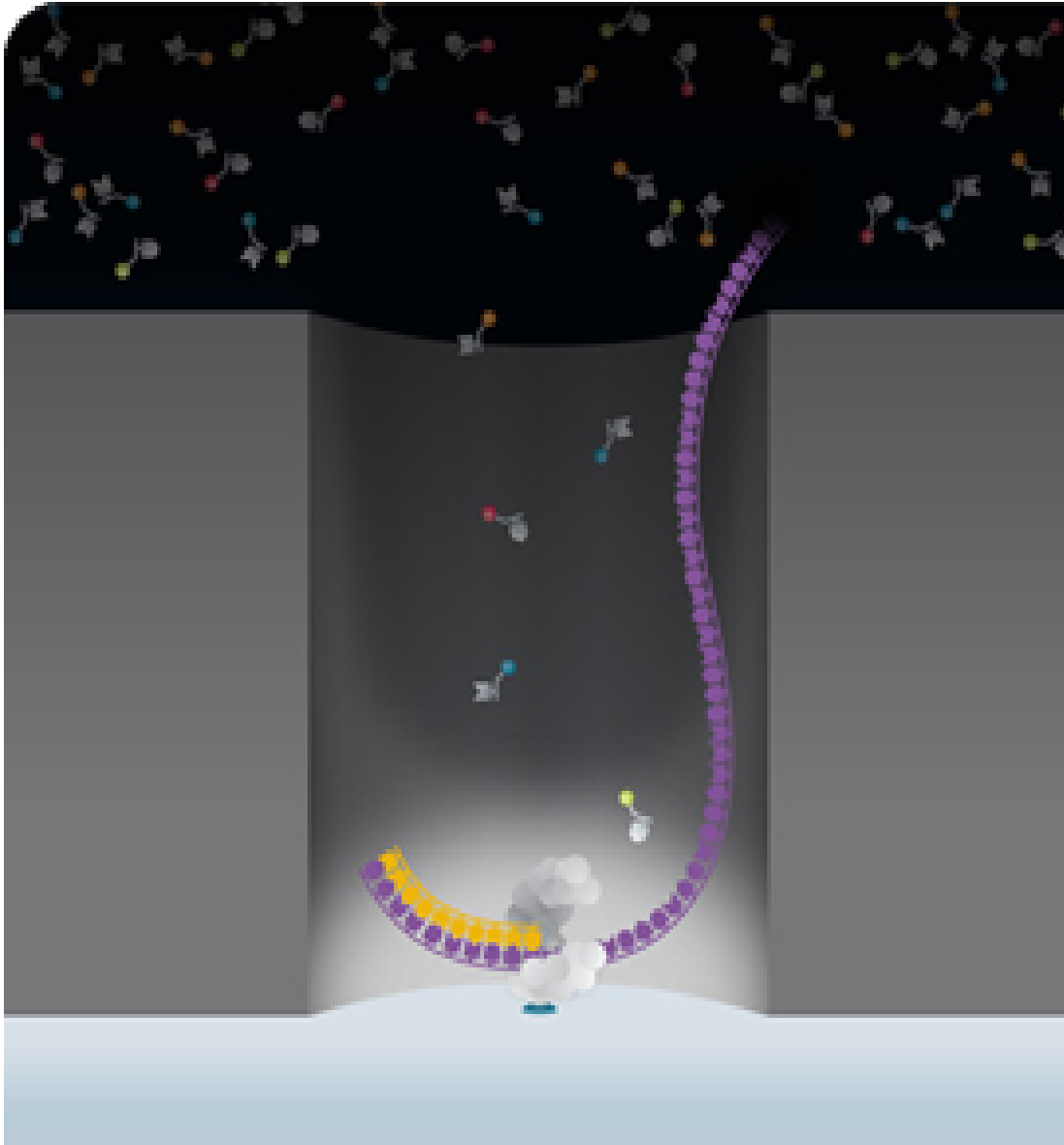
Chemie

Fluorescenčně značené nukleotidy (4 barvy)

Nemá cykly ← real-time

Masivně paralelní sekvenování

Technologie SMRT



With an active polymerase immobilized at the bottom of each ZMW, nucleotides diffuse into the ZMW chamber. In order to detect incorporation events and identify the base, each of the four nucleotides A, C, G and T are labeled with a different fluorescent color. Since only the bottom 30nm of the ZMW is illuminated, only those nucleotides near the bottom fluoresce.

Masivně paralelní sekvenování

Technologie SMRT

Výhody

Velmi dlouhé fragmenty

Single molecule

Nevýhody

Nová technologie

Chybovost ?

Dostupné přístroje

PACBIO RS



<http://www.pacificbiosciences.com/aboutus/video-gallery>

<http://www.dnatube.com/video/3003/SMRT-DNA-Sequencing>

Masivně paralelní sekvenování

Oxford Nanopore

Nanopores – exonuclease, strand sequencing

<http://www.nanoporetech.com/sequences>

Life Technologies

technologie podobná SMRT

fluorescence generovaná během inkorporace nukleotidu

Přenos energie z Qdot nanokrystalu na polymeráze

ZS Genetics, Halcyon Molecular, Toste research group at UC Berkeley

Elektronová mikroskopie vlákna DNA