



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 II

24.3. 2011

Boris Tichý



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Masivně paralelní sekvenování

Technologie Illumina (Solexa)

Nejrozšířenější

“Bridge” amplifikace + sekvenování s reverzibilními terminátory

Flow cell

Sekvenační reakce ve shlucích (clusters) náhodně na ploše

Kratší fragmenty, velmi vysoká kapacita

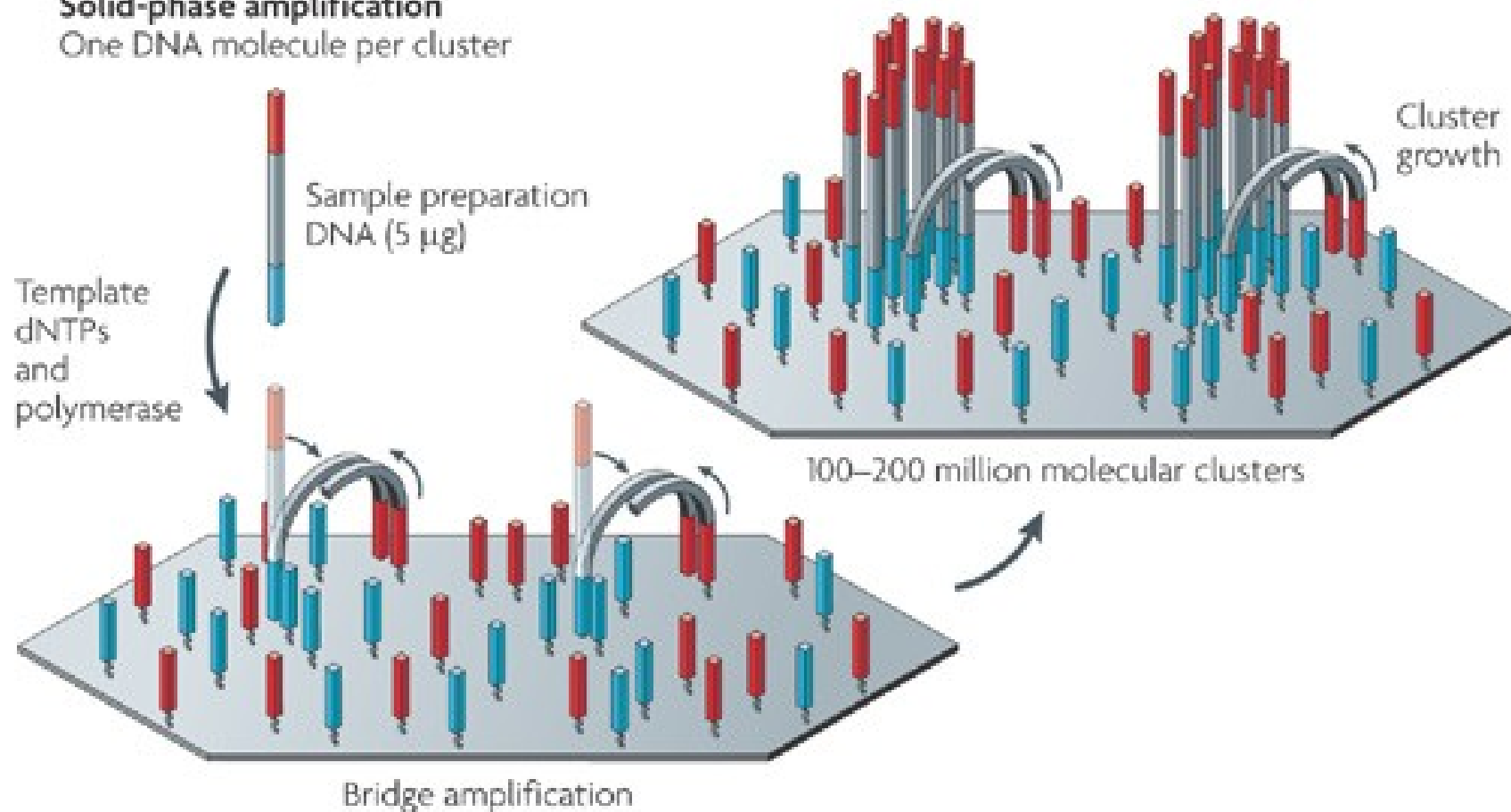
Chemie

Fluorescenčně značené (4 barvy) reverzibilně terminační nukleotidy

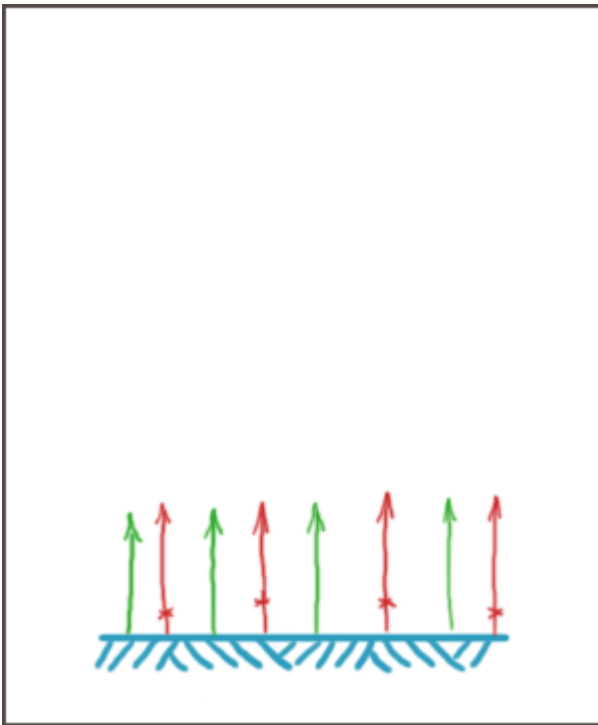
Všechny čtyři nukleotidy/cyklus

Bridge amplifikace

b Illumina/Solexa
Solid-phase amplification
One DNA molecule per cluster

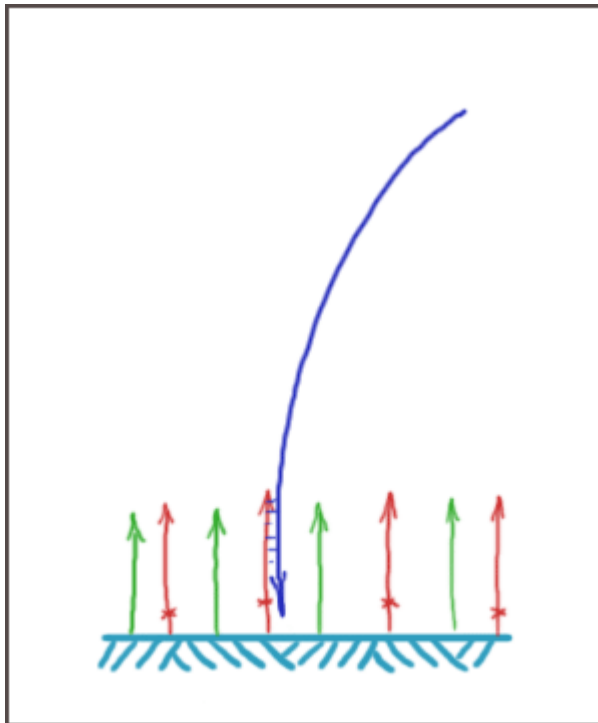


Bridge amplifikace



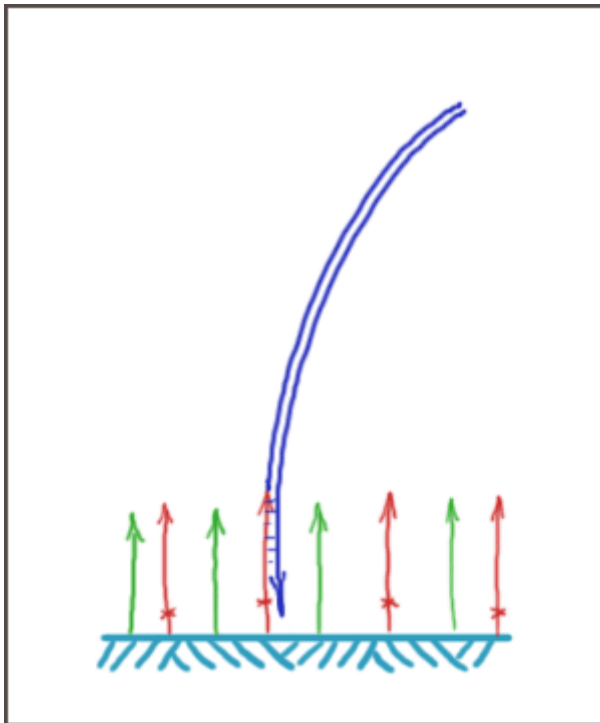
Two PCR primers are attached to the surface of flowcell. One of the primers has a cleavable site (cross on red primer);

Bridge amplifikace



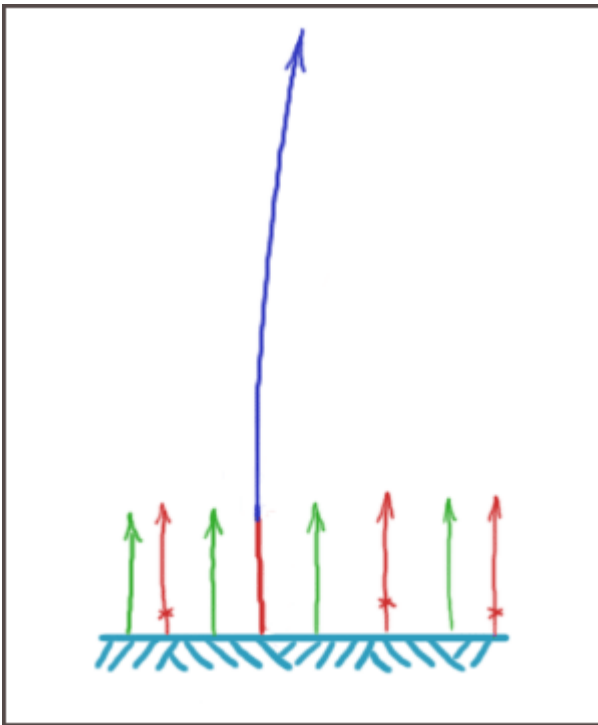
Preamplified library is denatured in NaOH, then hybridization buffer is added to shift pH to neutral value. Library is loaded into the channel in neutral aqueous solution. DNA molecules can hybridize to the PCR primers. Red primer hybridize with a library molecule on the picture (complementary strand of this molecule have a chance to form a hybrid with a green primer).

Bridge amplifikace



Elongation reaction: extension mix (buffer, dNTP's, Taq polymerase) is pumped into a channel.
Hybridized primer extended on library molecule.

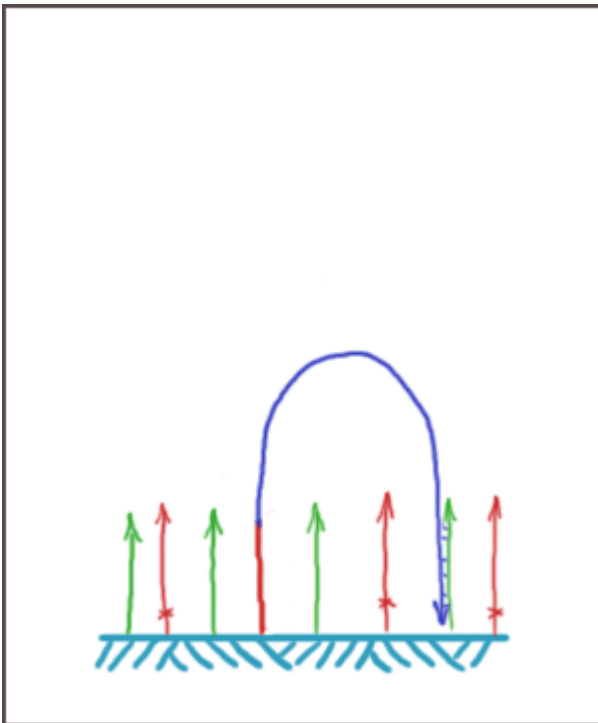
Bridge amplifikace



Formamide

Original library molecule is denatured and washed away.

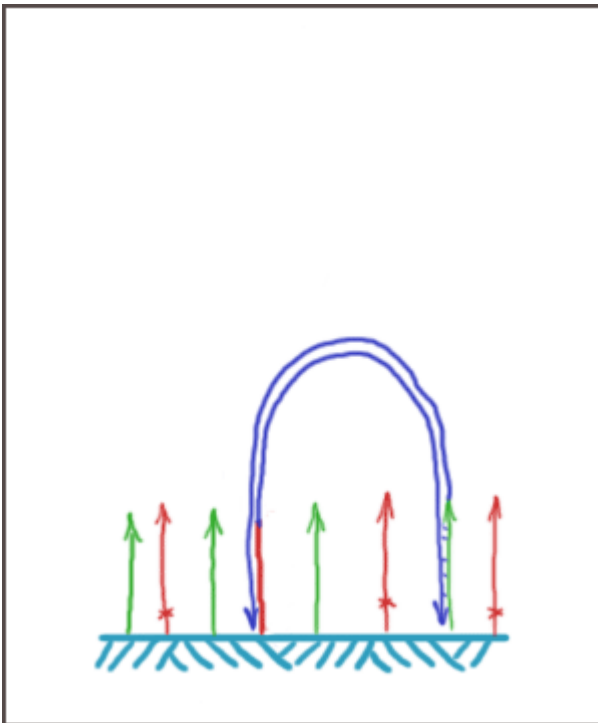
Bridge amplifikace



Extension buffer

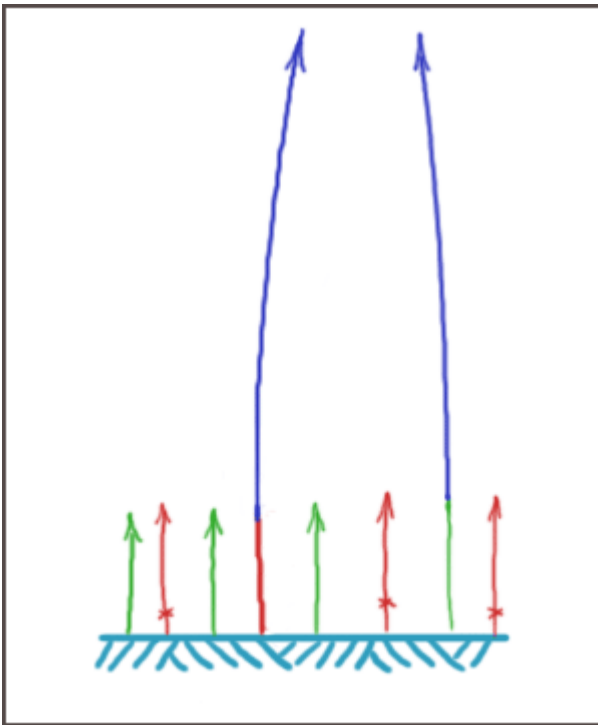
Extended molecule bends and hybridizes to a second PCR primer (forms a bridge).

Bridge amplifikace



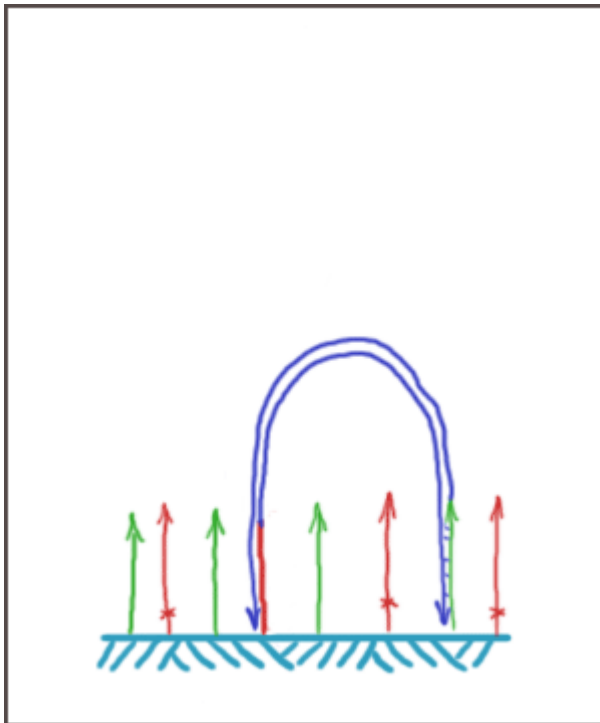
Extension mixture
Extension of hybridized primer.

Bridge amplifikace



Formamide washing
Two DNA strands are denatured.

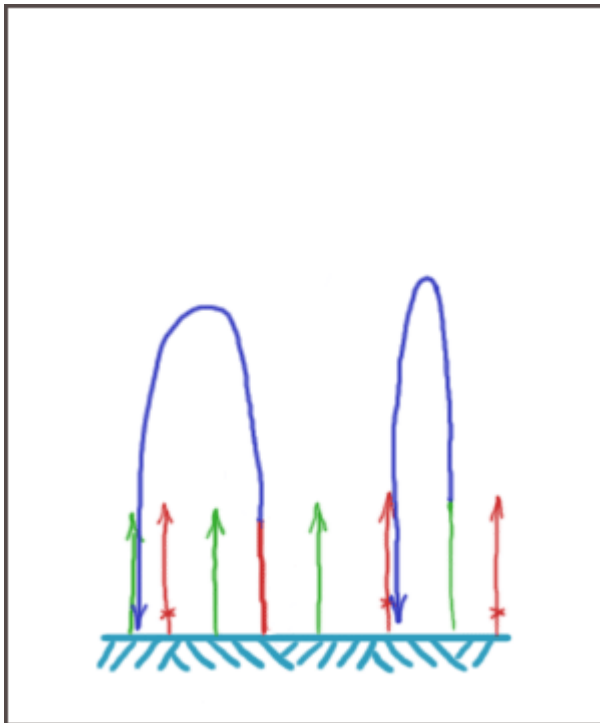
Bridge amplifikace



Extension buffer

Extended molecules may hybridize to each other again or find other PCR primers.

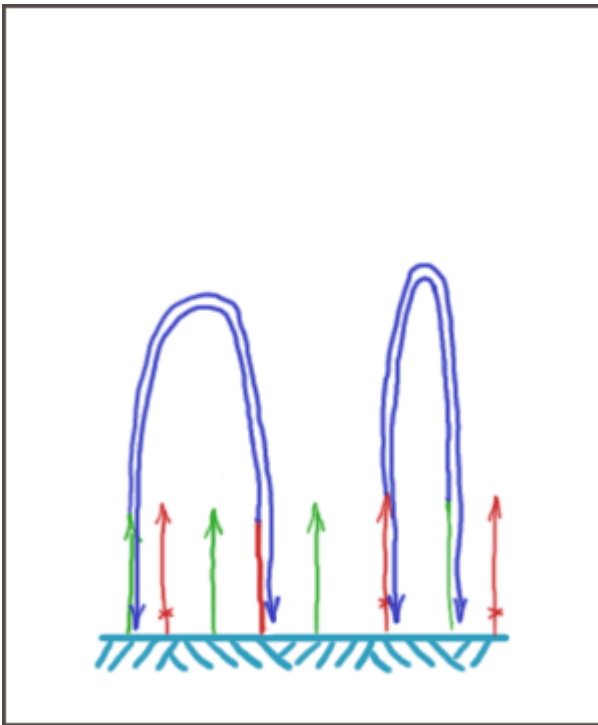
Bridge amplifikace



Extension buffer

Extended molecules may hybridize to each other again or find other PCR primers.

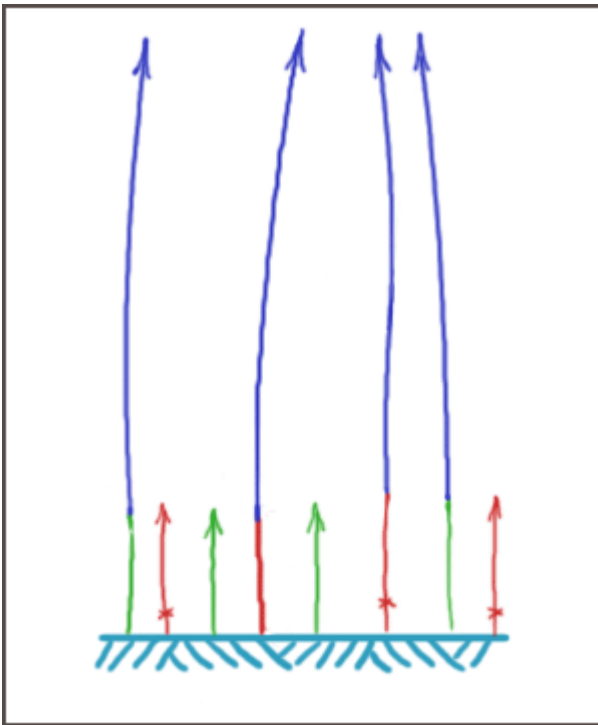
Bridge amplifikace



Extension mixture

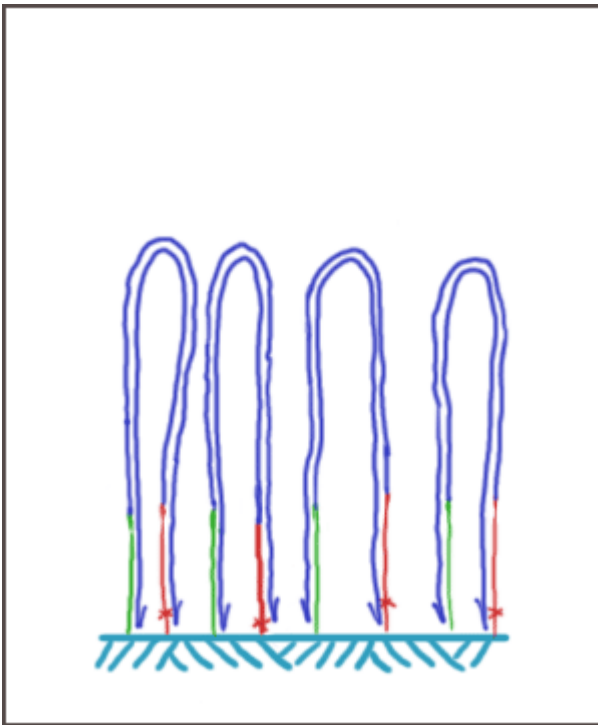
In the second case they will duplicate again.

Bridge amplifikace



Formamide washing
DNA strands are denatured.

Bridge amplifikace

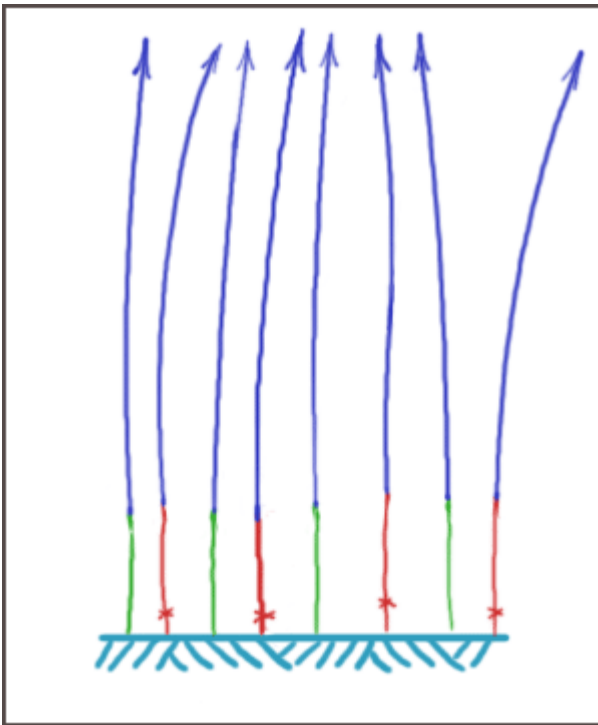


After 35 cycles cluster consists on a number of double-stranded bridges.

Masivně paralelní sekvenování

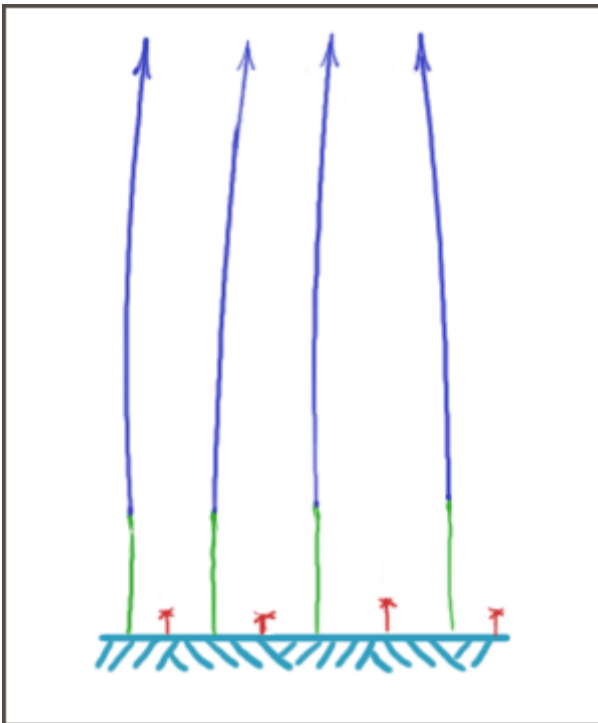
Technologie Illumina

Bridge amplifikace



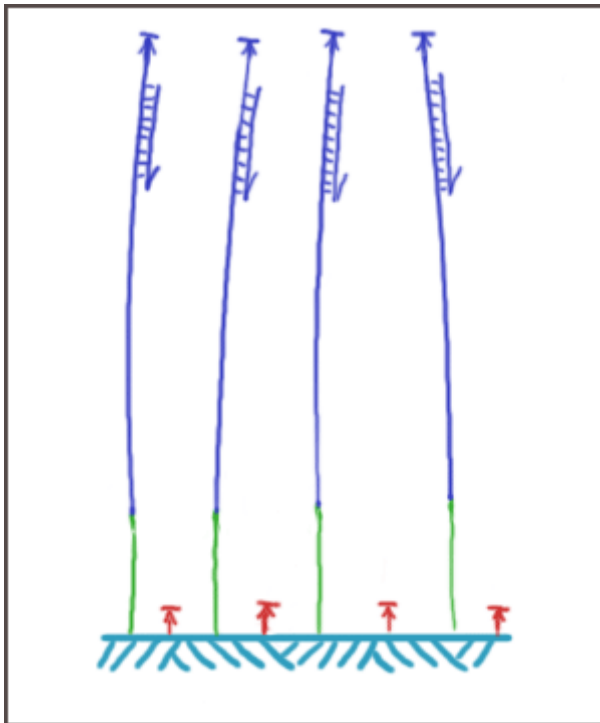
DNA is denaturated.

Bridge amplifikace



One primer is cut off and washed out.

Bridge amplifikace



the last operations, which are done on Cluster station are:

- * * blocking of all 3' ends (ddNTP's and terminal transferase) to prevent extension of DNA molecules on each other;
- * annealing of sequencing primer.

Masivně paralelní sekvenování

Technologie Illumina

Bridge amplifikace

Masivně paralelní sekvenování

Technologie Illumina

Bridge amplifikace

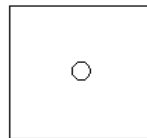
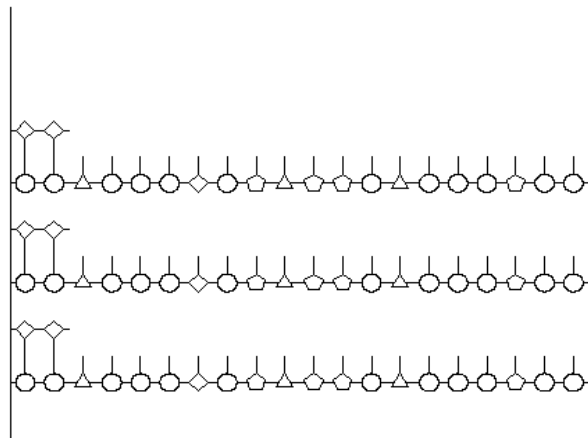
Masivně paralelní sekvenování

Technologie Illumina

Bridge amplifikace

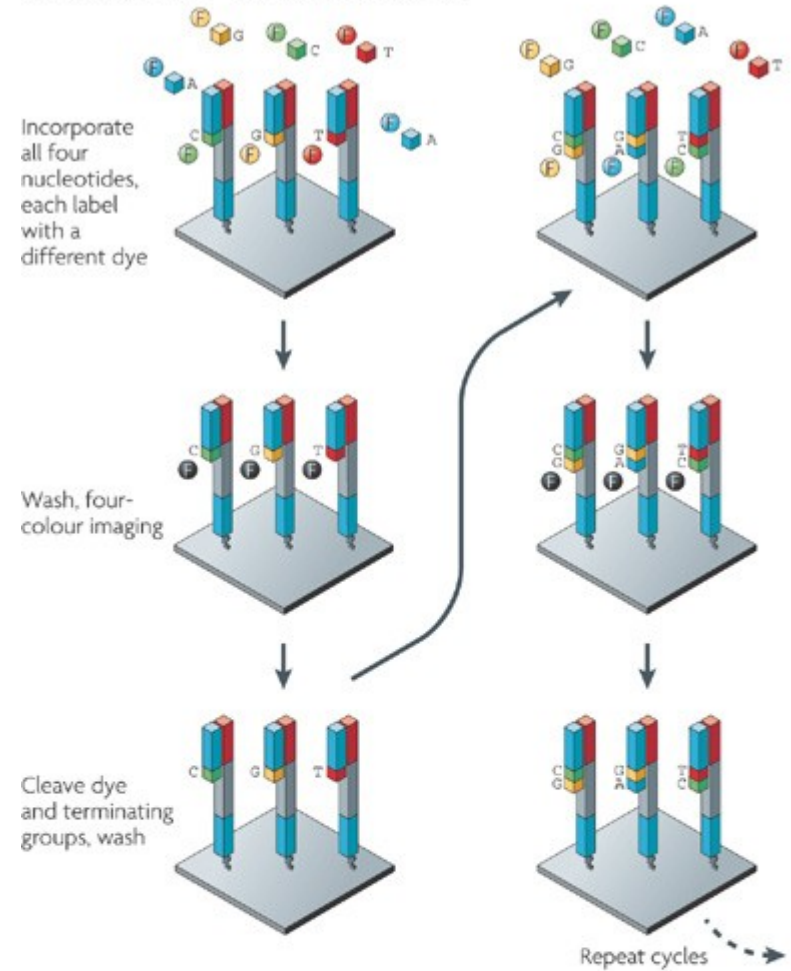
Masivně paralelní sekvenování

Sekvenování s reverzibilními terminátory

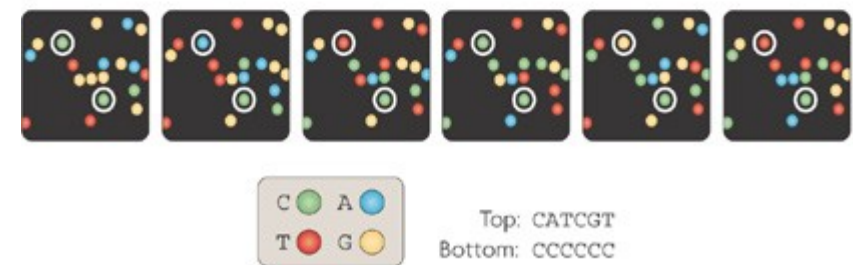


Technologie Illumina

a Illumina/Solexa — Reversible terminators



b



Masivně paralelní sekvenování

Technologie Illumina

Sekvenování s reverzibilními terminátory

Masivně paralelní sekvenování

Technologie Illumina

Sekvenování s reverzibilními terminátory

Masivně paralelní sekvenování

Technologie Illumina

Sekvenování s reverzibilními terminátory

Masivně paralelní sekvenování

Technologie Illumina

Sekvenování s reverzibilními terminátory

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

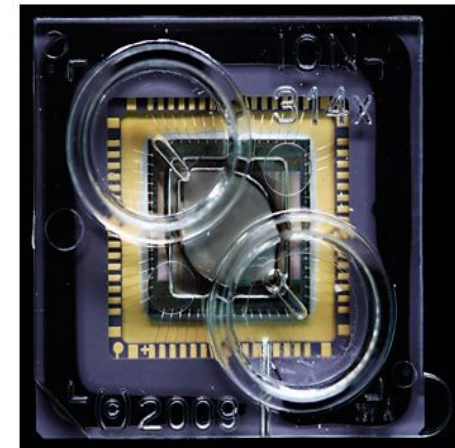
Malá kapacita, zatím kratší fragmenty (100+)

Nízká cena

Chemie

Nemodifikované nukleotidy

Jeden typ nukleotidu/cyklus



Masivně paralelní sekvenování

Technologie Ion Torrent

