

Sekvenační knihovny

Knihovna

Soubor různých fragmentů DNA, se kterými lze pracovat jednotným způsobem

Klasická DNA/cDNA knihovna

Klonování genomu/cDNA do vektorů

Sekvenační knihovna

Přidání sekvencí, které umožňují amplifikaci (klonální) a sekvenování

Sekvenační knihovny

Několik stovek typů

Vstup

DNA, RNA, krátké RNA, crosslinkovaná DNA/RNA

Přidání adaptorů

Ligace, tagmentace, PCR

Selekce sekvencí

Hybridizace, PCR, imunoprecipitace

Sekvenační knihovny



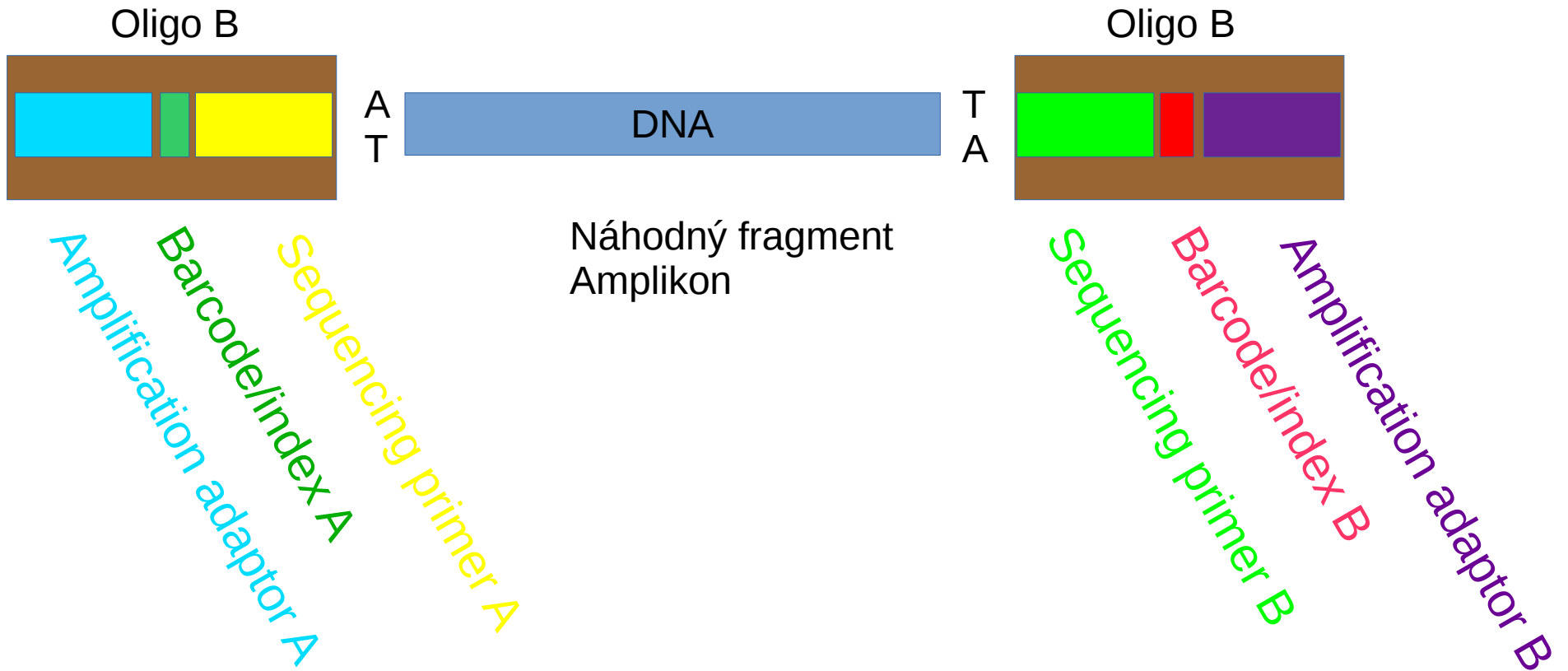
Amplification adaptor A
Barcode/index A
Sequencing primer A

Sequencing primer B
Barcode/index B
Amplification adaptor B

Sekvenační knihovny - Ligace

Celé genomy
Základ pro obohacování
Amplikony
ChIP, cDNA

3 kroky:
End repair
A-tailing
Ligation (A-T)



Sekvenační knihovny - PCR

Jednotlivé geny
Metagenomika - 16S

Primer B



DNA



Primer A



Sequencing primer B
Barcode/index B
Amplification adaptor B

Amplification adaptor A
Barcode/index A
Sequencing primer A

Sekvenační knihovny – dvoukolová PCR

Jednotlivé geny
Metagenomika - 16S

Primer B - ext

Primer B - int

DNA

Primer A - int

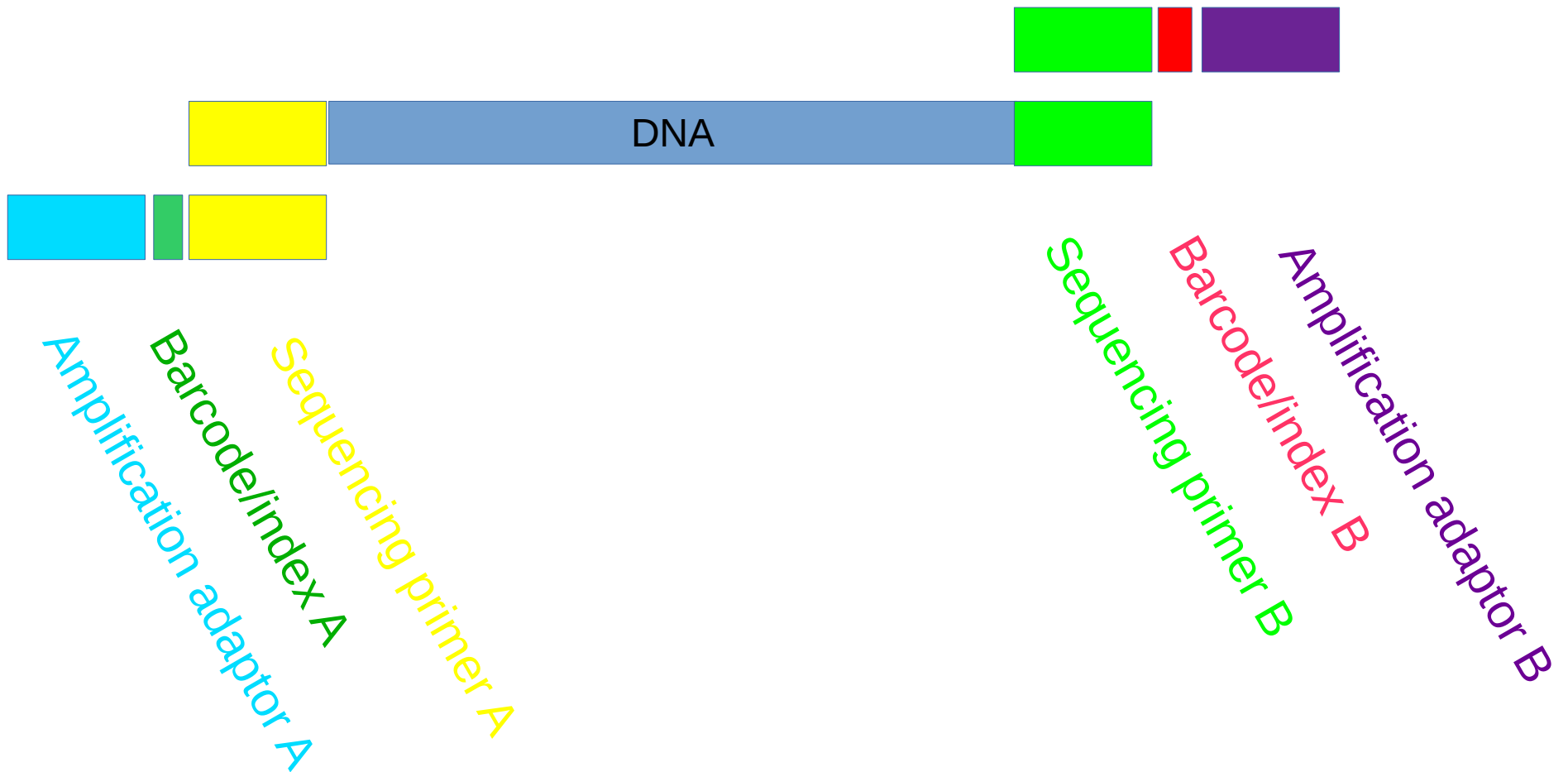
Primer A - ext

Sequencing primer B
Barcode/index B
Amplification adaptor B

Amplification adaptor A
Barcode/index A
Sequencing primer A

Sekvenační knihovny - tagmentace

Fragmentace a připojení části adaptorů v jednom kroku
Transpozáza
Dokončení pomocí PCR



Cílený screening

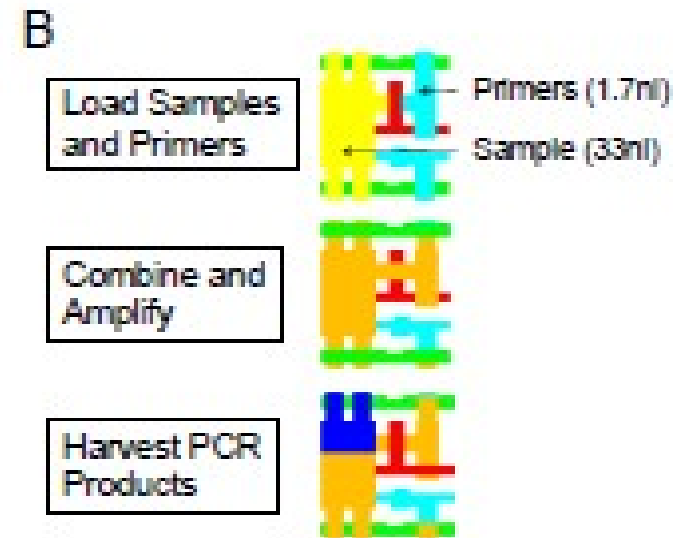
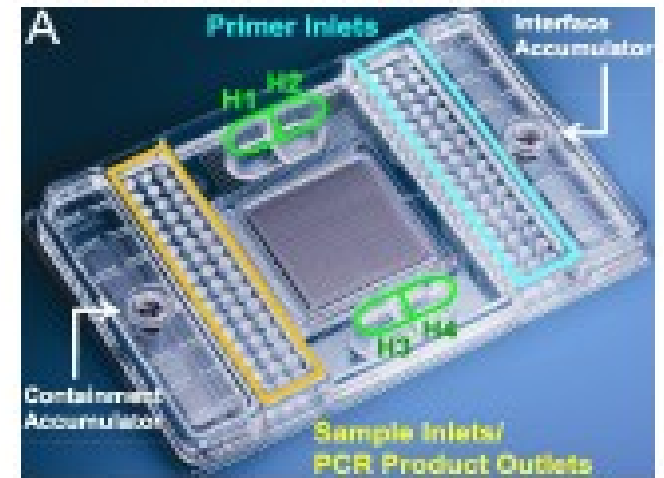
Exome sequencing

Všechny exprimované geny
Většinou včetně nekódujících
Hybridizace (v roztoku)

Gene enrichment

Jeden gen – např. dědičné poruchy
PCR, hybridizace
multiplexing
Skupiny genů – např. multifaktoriální nemoci, nádory
PCR, hybridizace
Úseky genomu – strukturní aberace
hybridizace

Figure 1: The Access Array System



Cílené sekvenování (targeted resequencing)

Hybridizace

Exomy, genové panely
Cílená exprese

(Molekulární) inverzní proby

HaloPlex

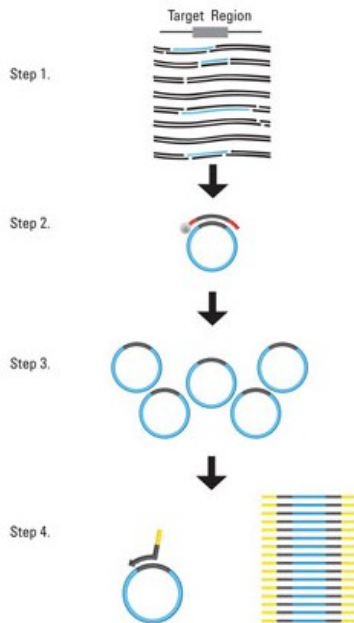
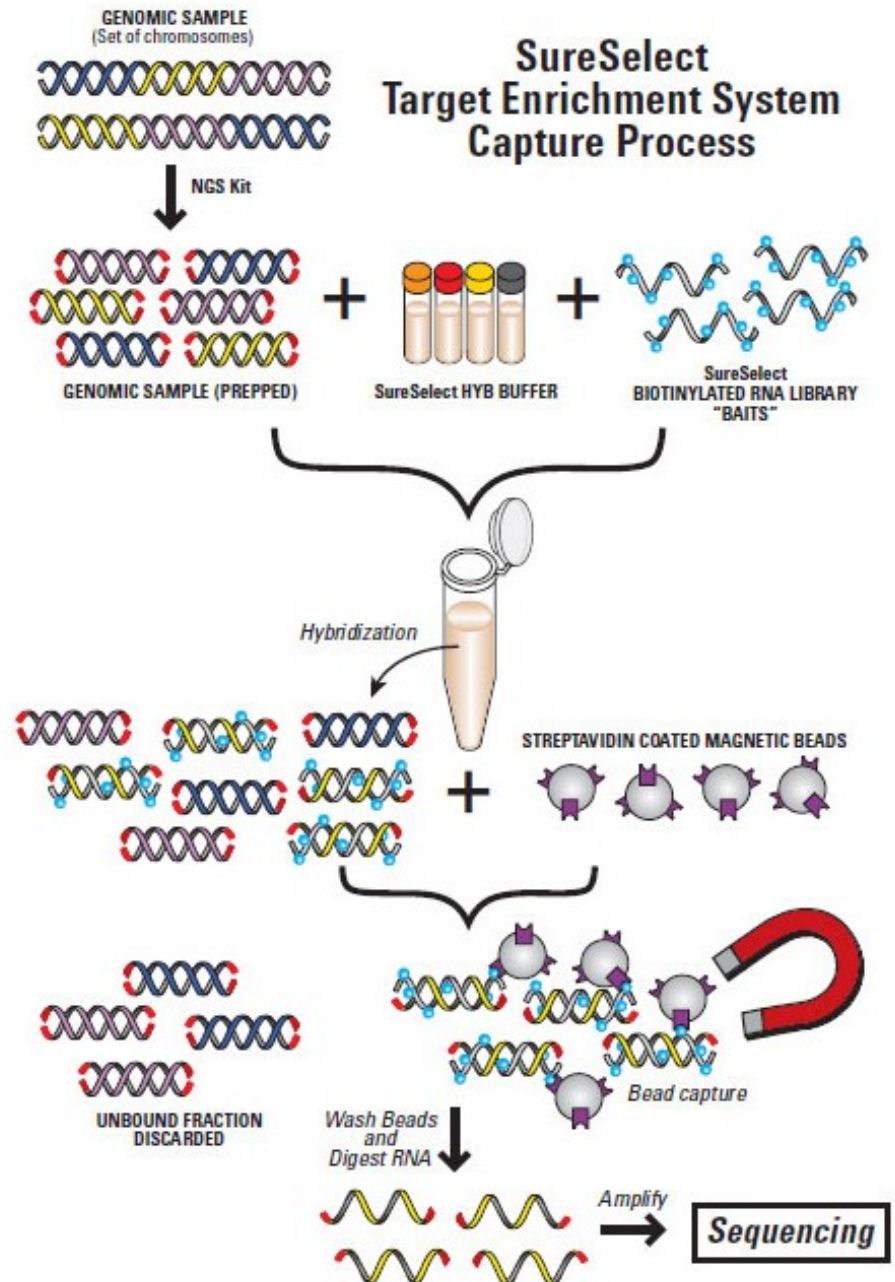


Figure 1. HaloPlex workflow.



PCR enrichment – (masivně) paralelní PCR

Fluidigm AccessArray

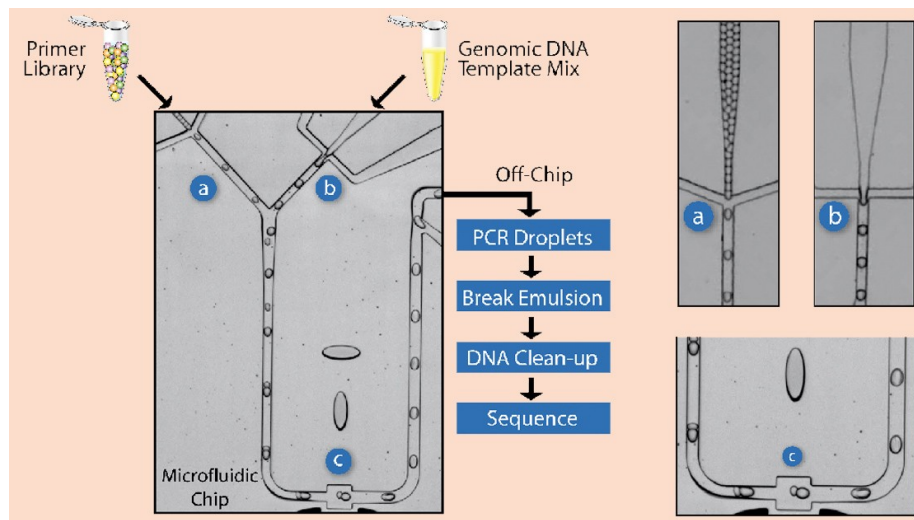
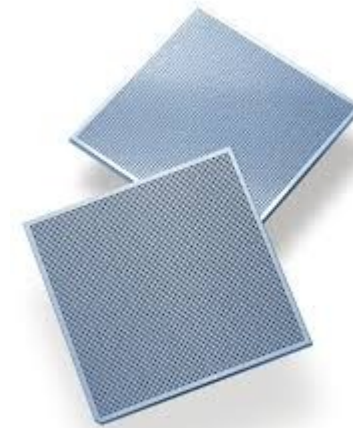
48x48 reakcí, objem 10nL

Wafergen SmartChip TE

5184 reakcí, 100nL

RainDance

AŽ 20.000 párů primerů, miliony reakcí, objem pL



Knihovny pro epigenomiku

Metylace

MeDIP-Seq – protilátka proti metC

BS-Seq – bisulfitová konverze, rozlišení na bázi

Protein-DNA interakce

ChIP-Seq – crosslink DNA/protein, vychytání protilátkou

Aktivní chromatin

DNase-Seq

