

# 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



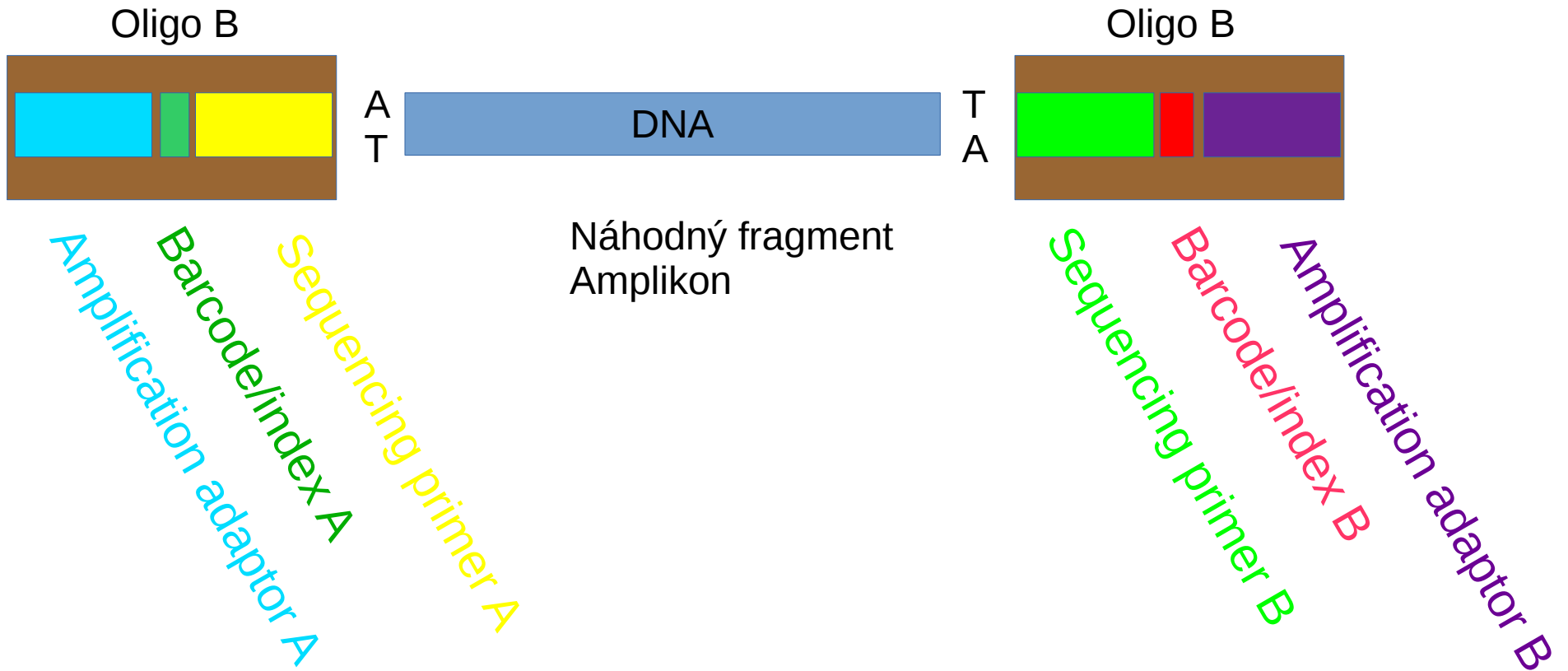
Amplification adaptor A  
Barcode/index A  
Sequencing primer A

Sequencing primer B  
Barcode/index B  
Amplification adaptor B

# Sekvenační knihovny - Ligace

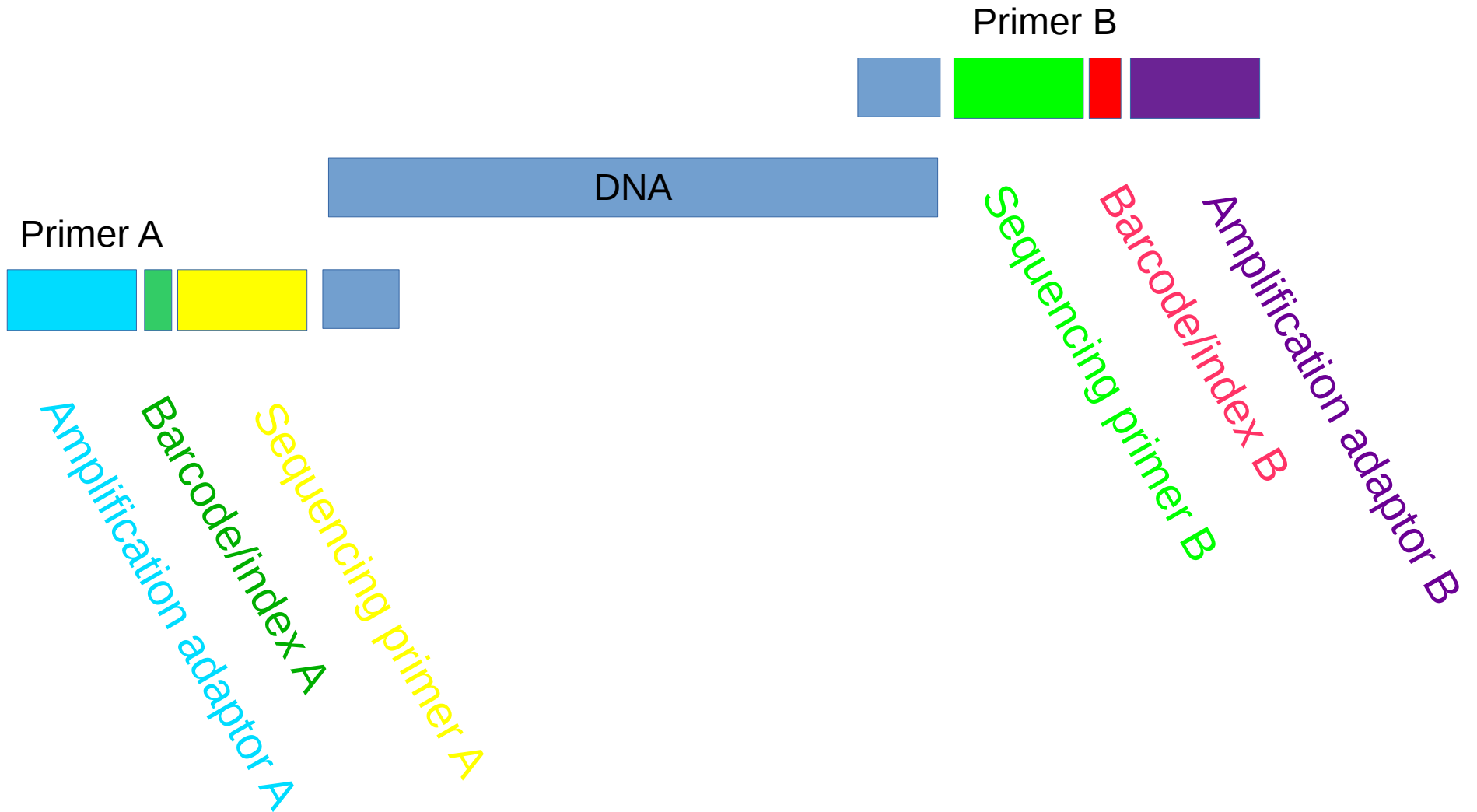
Celé genomy  
Základ pro obohacování  
Amplikony  
ChIP, cDNA

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



# Sekvenační knihovny - PCR

Jednotlivé geny  
Metagenomika - 16S



# Sekvenační knihovny – dvoukolová PCR

Jednotlivé geny  
Metagenomika - 16S

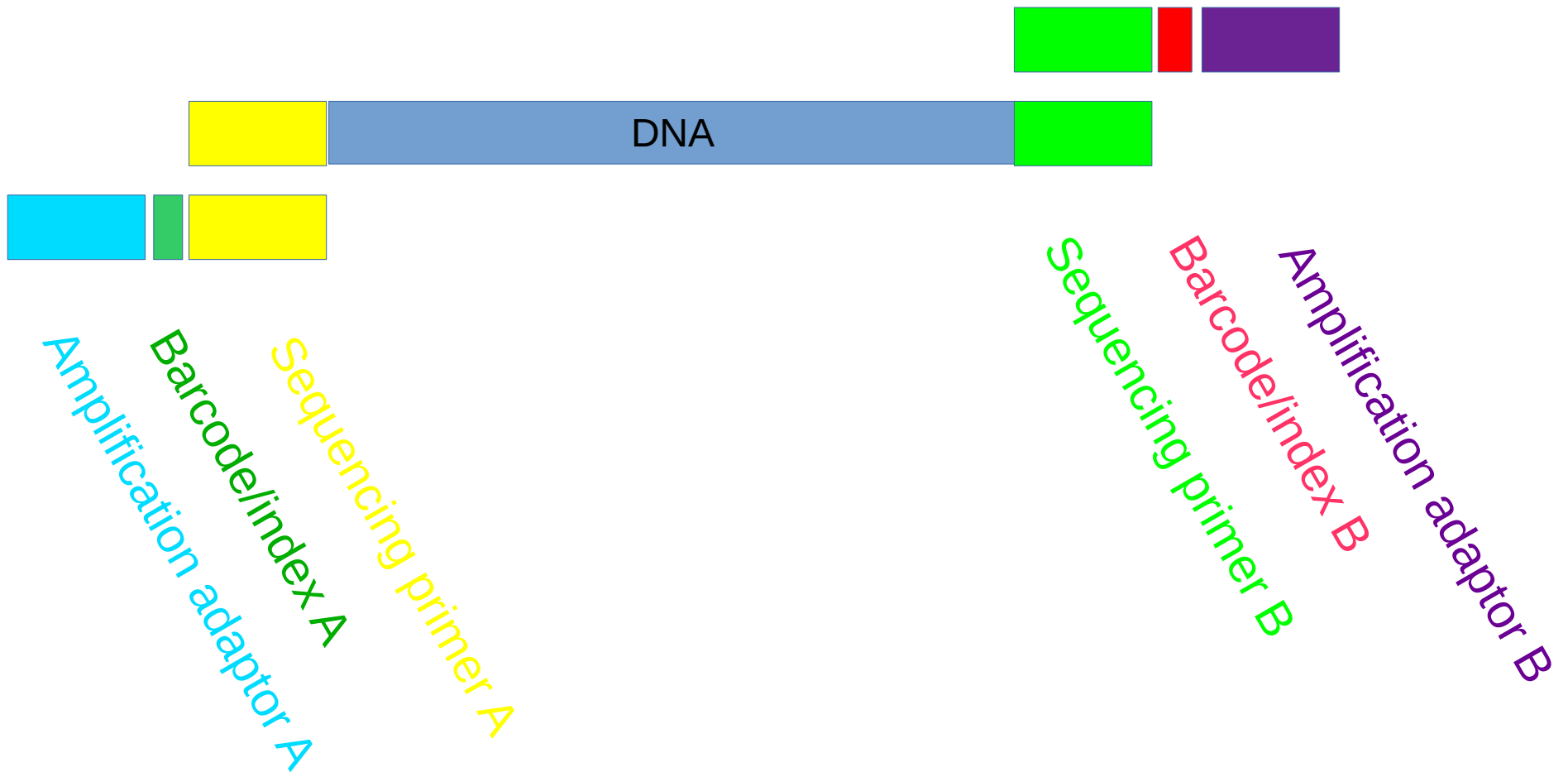


Sequencing primer B  
Barcode/index B  
Amplification adaptor B

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

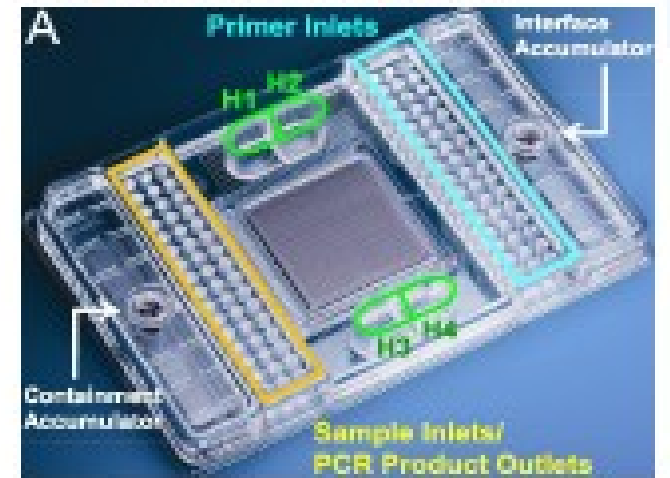
## Exome sequencing

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



B



C



# Cílené sekvenování (targeted resequencing)

## Hybridizace

Exomy, genové panely  
Cílená exprese

## (Molekulární) inverzní proby

### HaloPlex

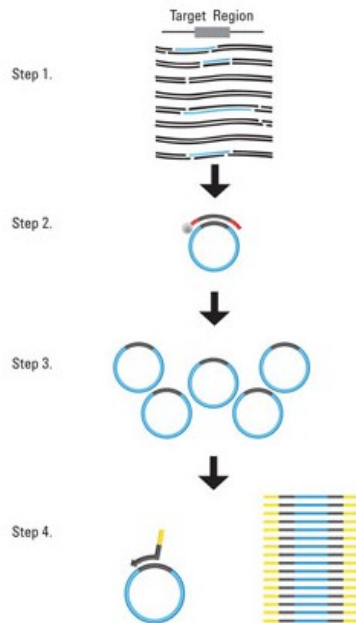
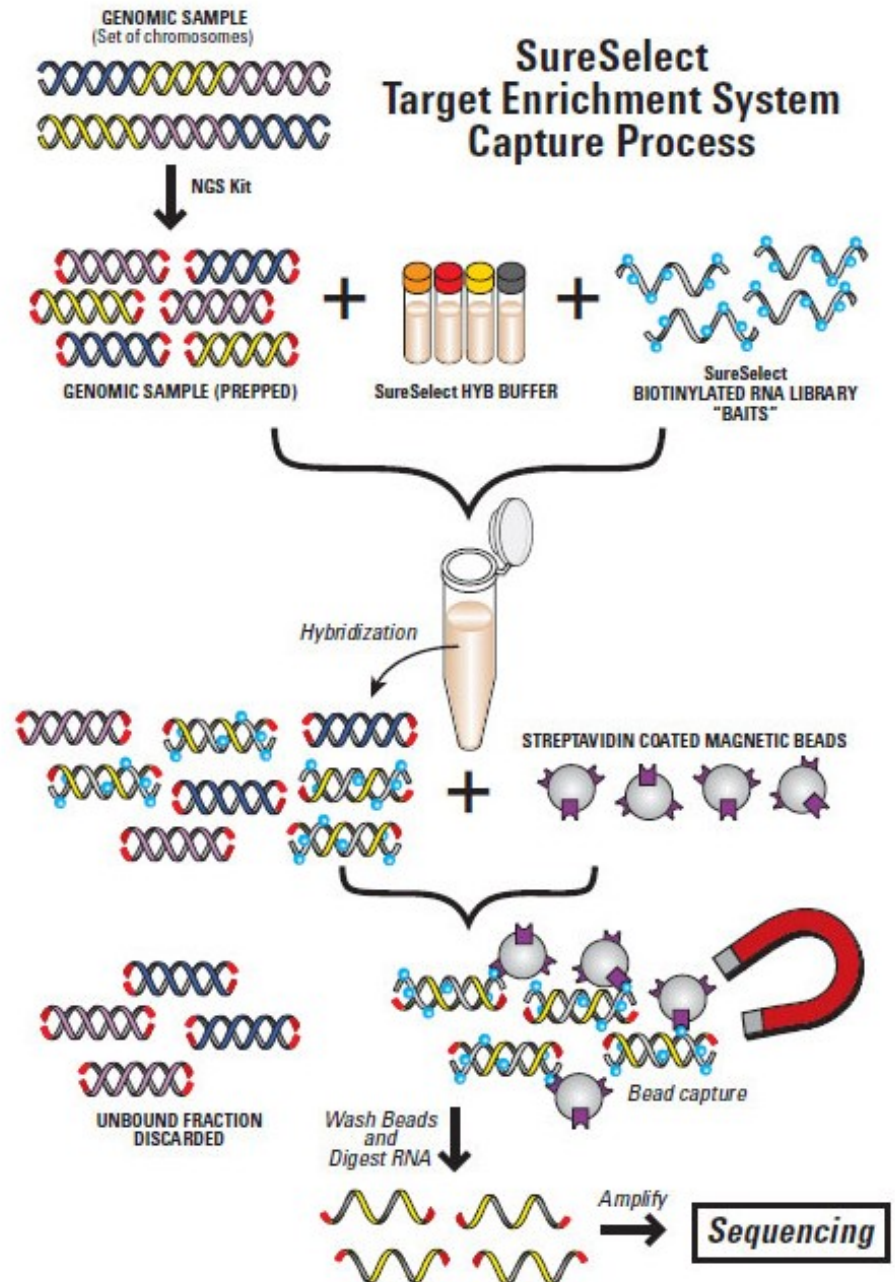


Figure 1. HaloPlex workflow.



# PCR enrichment – (masivně) paralelní PCR

Fluidigm AccessArray

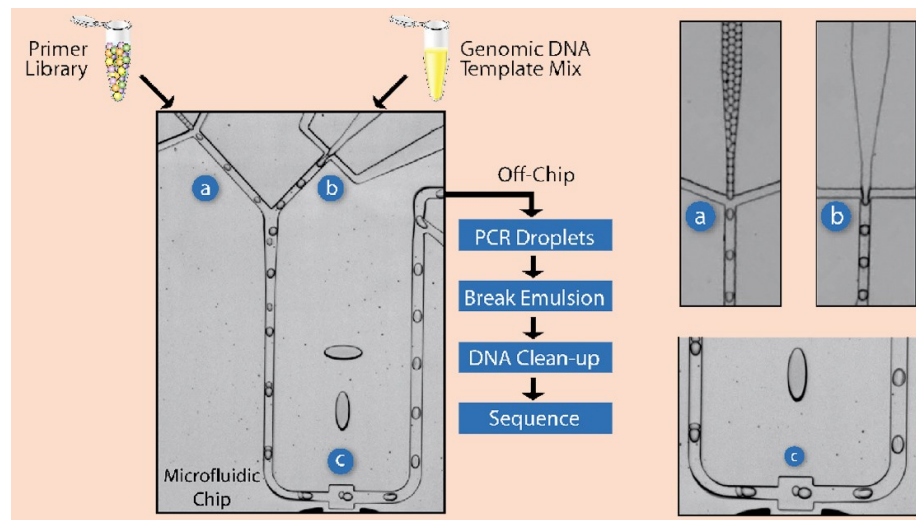
48x48 reakcí, objem 10nL

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





