



Středoevropský technologický institut
BRNO | ČESKÁ REPUBLIKA

Sekvenační knihovny

Boris Tichý

Sdílená laboratoř Genomika

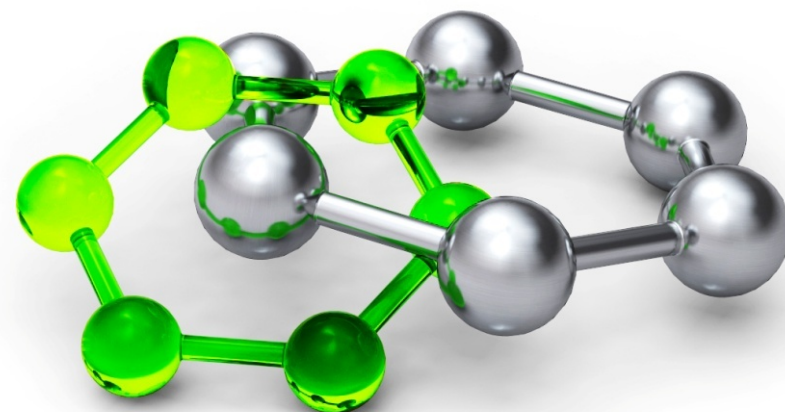
Brno, 16.10.2017



EVROPSKÁ UNIE
EVROPSKÝ FOND PRO REGIONÁLNÍ ROZVOJ
INVESTICE DO VAŠÍ BUDOUCNOSTI



OP Výzkum a vývoj
pro inovace



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

DNA fragmentation

Mechanical

- Ultrasound (Covaris)

- Hydrodynamic

- Nebulization

Enzymatic

- Restriction endonucleases

- Fragmentase®

- Transposase

Illumina

- Cluster density depends on fragment length

- Short fragments cluster better

- Mix of longer and shorter fragments is problematic

- Max <1000bp

- Longer fragments are problematic

 - Broader length distribution =>

 - Uneven cluster generation effectivity

 - Problematic conc. measurement

Sekvenační knihovny



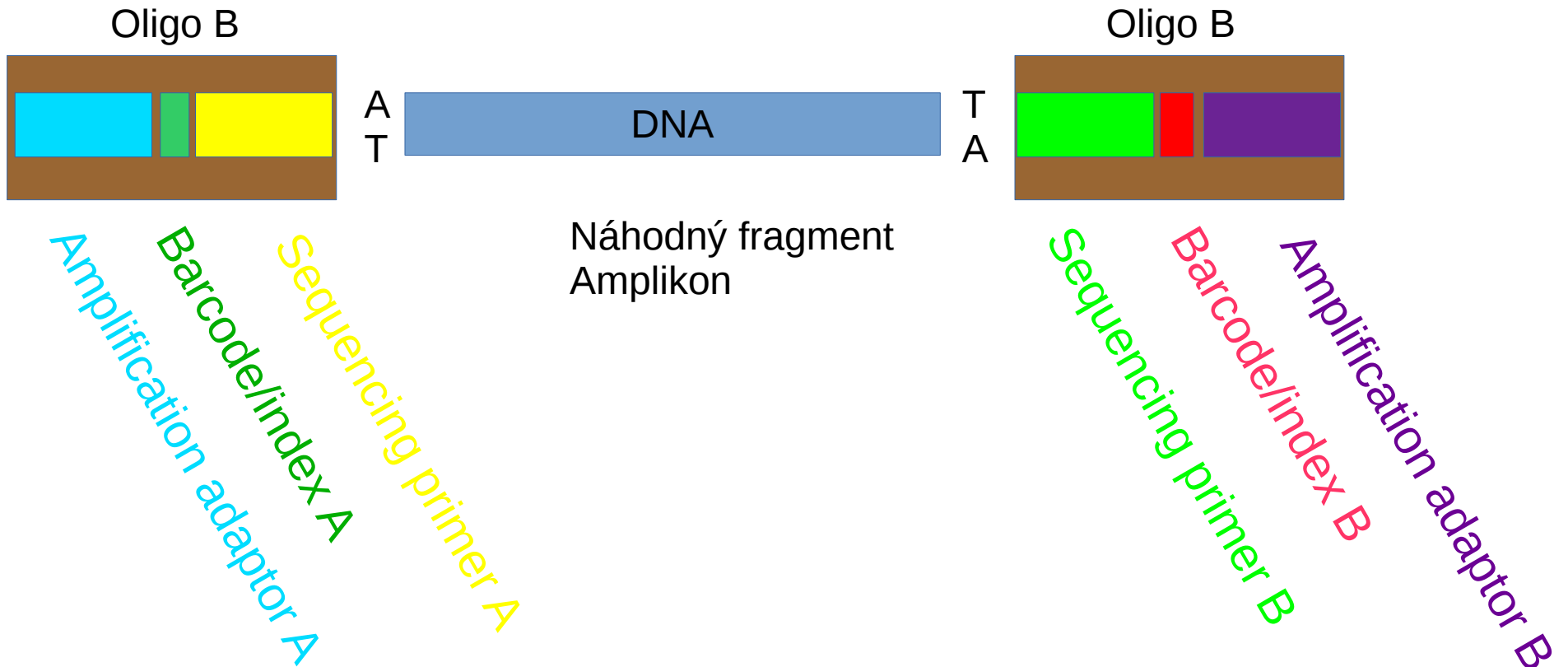
Amplification adaptor A
Barcode/index A
Sequencing primer A

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)

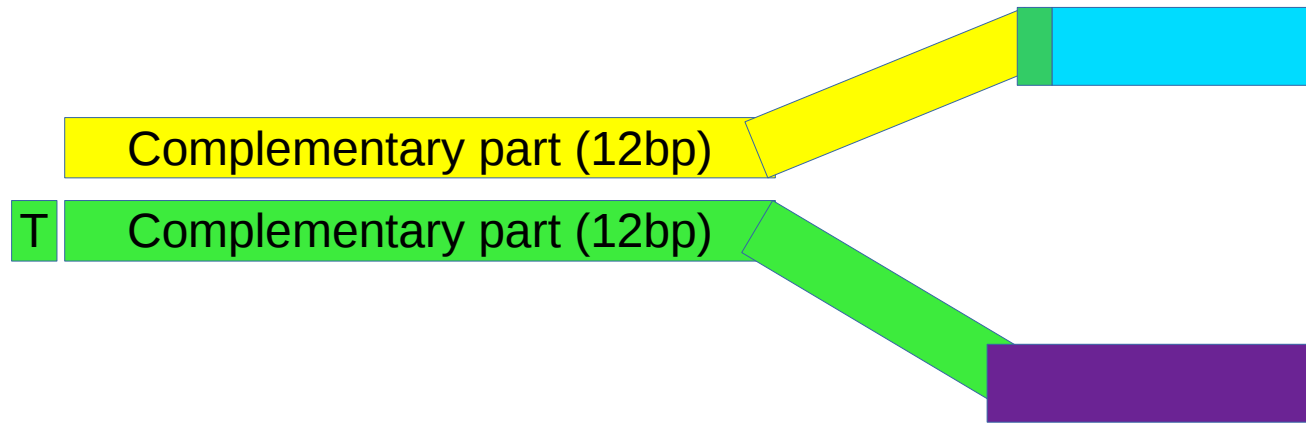


Library preparation

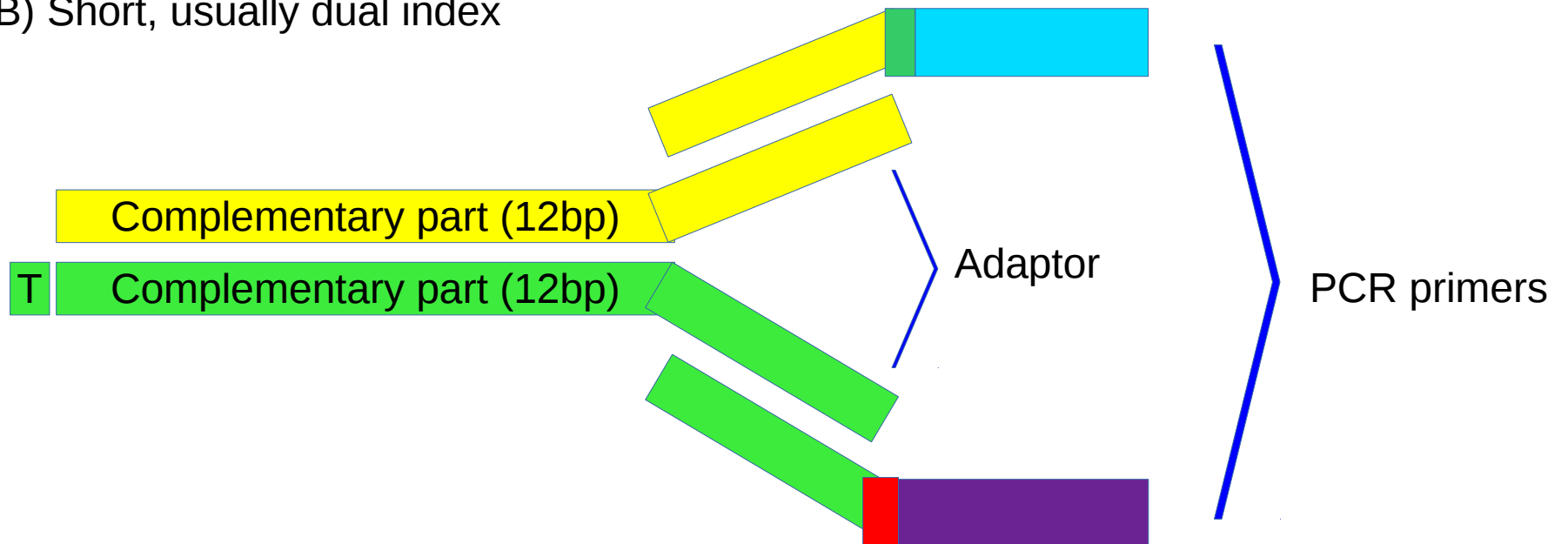
Adaptor structure

Ligation

A) Full-length, usually single index



B) Short, usually dual index



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

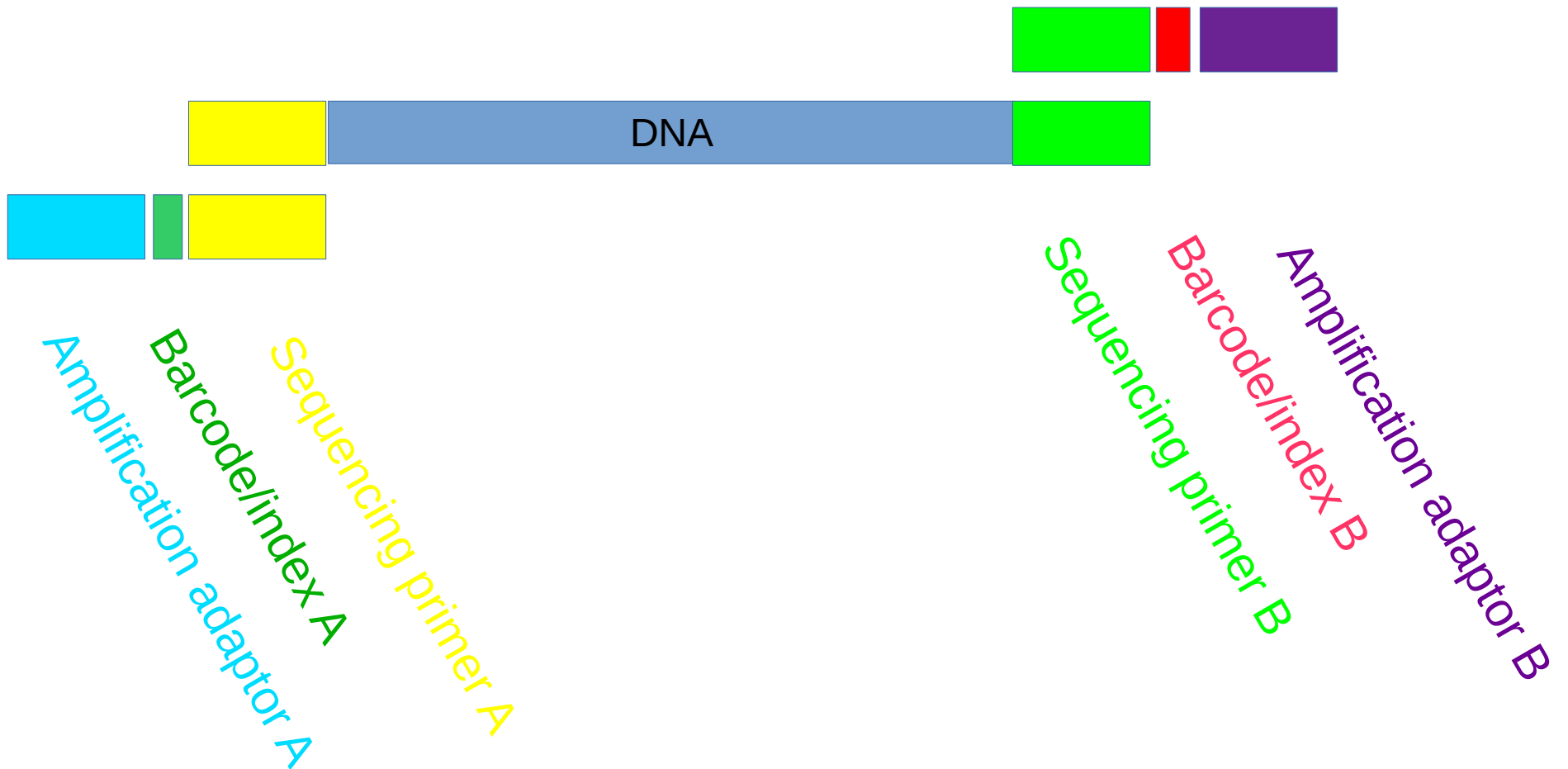
Primer A - ext

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

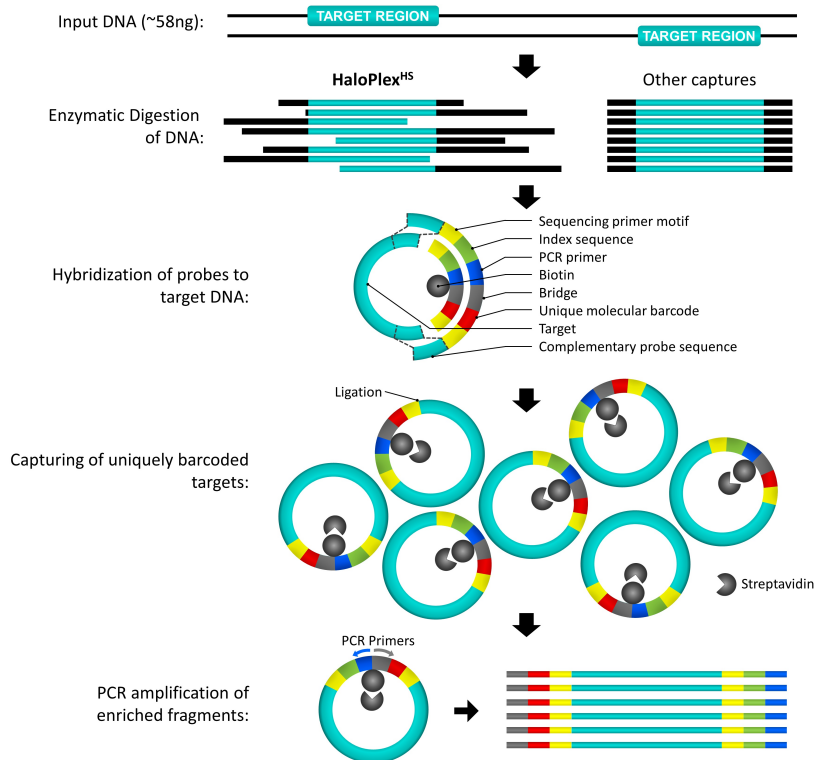


Library preparation

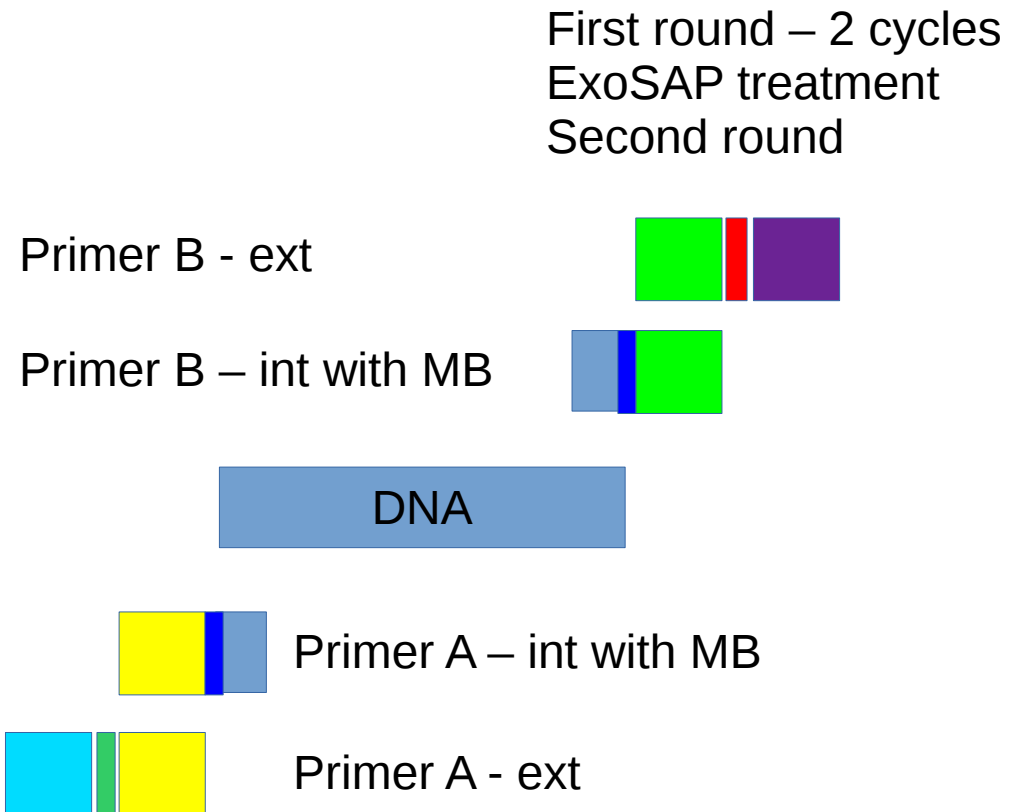
Molecular barcodes

Tag each input molecule with random sequence =>
Lower coverage for variant calling
Better quantification of variants (eg. species in metagenomics)

Haloplex HS



SAFE-Seq



Library preparation

RNA

Convert RNA to cDNA (double stranded) → prepare DNA library

mRNA enrichment

RT primer vs. polyA selection beads

rRNA depletion

smallRNAs

Exception – ligate adaptors → cDNA → PCR

Full transcriptome sequencing

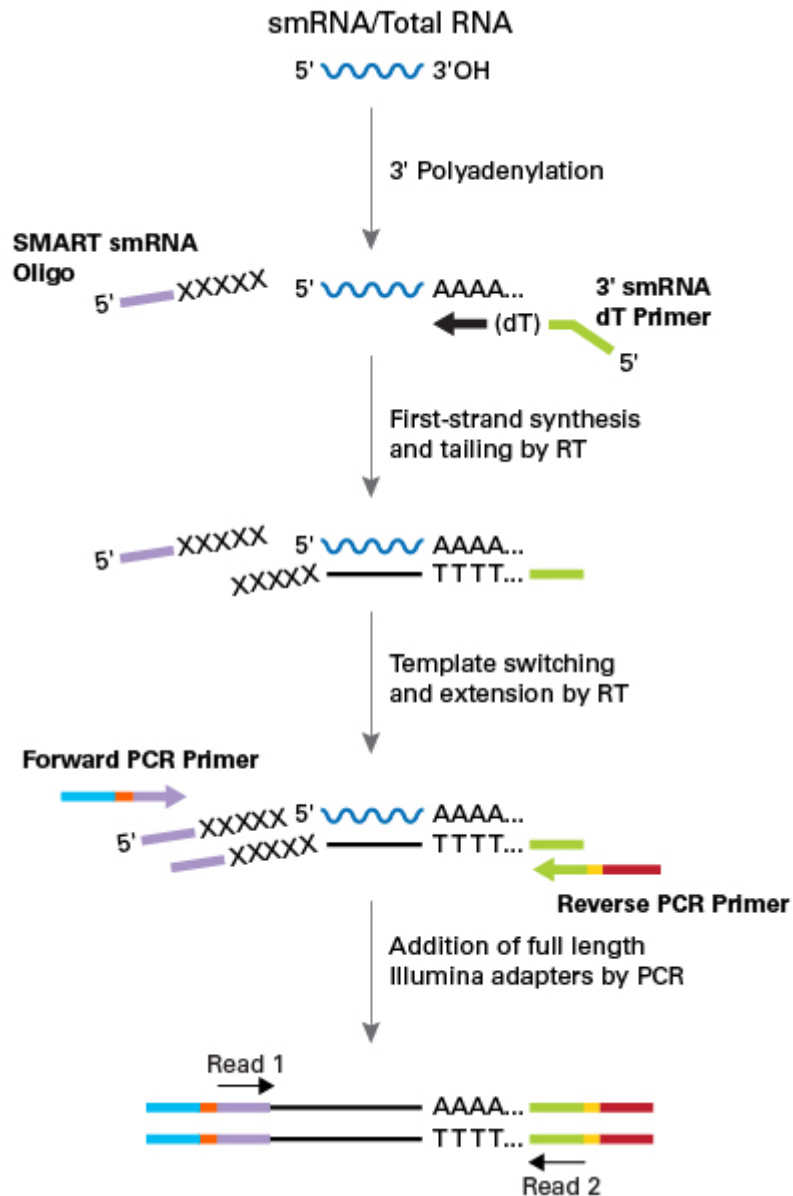
mRNA, all long transcripts excl. rRNA

3' sequencing (gene expression)

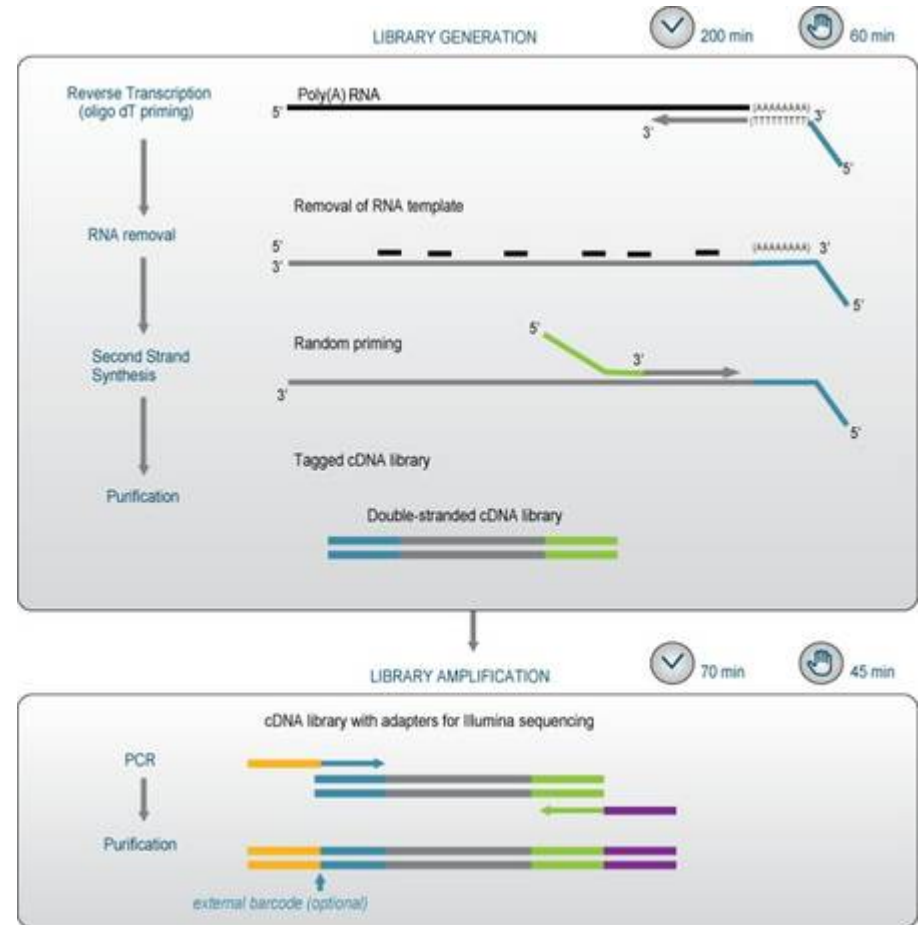
smallRNA sequencing

RNA

Smart-Seq

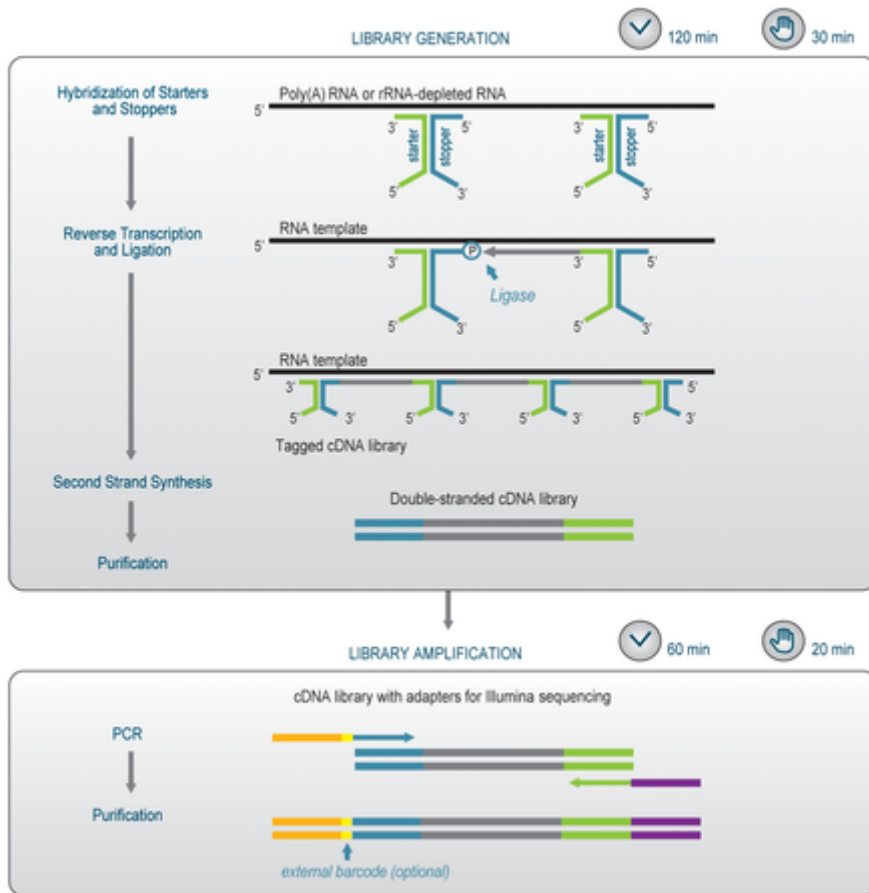


QuantSeq

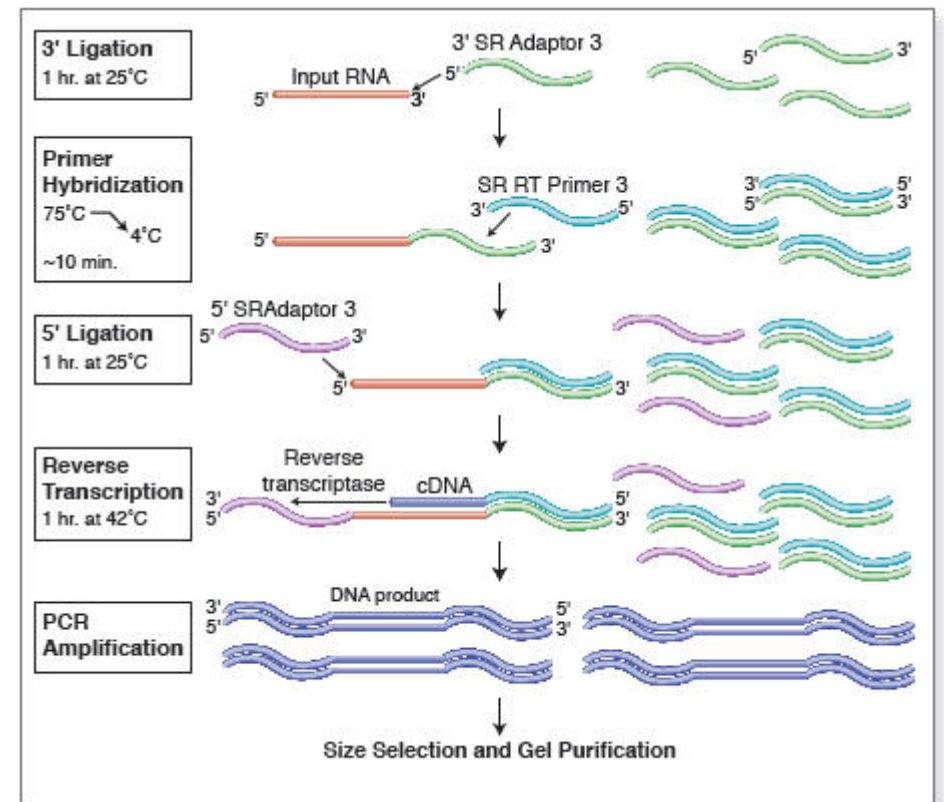


RNA

Lexogen SenseRNA



smallRNA



Library preparation

- ChIP
- CLIP
- PCR
- Size selection (RNA)
- Hybridization with capture probes
- Bacterial DNA enrichment
- Molecular inversion probes
- rRNA depletion
- ...

Target enrichment

- Hybridization
 - Exomes, gene panels, targeted RNA-Seq
 - In solution, on chip
- PCR
 - Multiplex PCR (Illumina, Multiplicom)
 - Massively parallel PCR (Fluidigm, Wafergen)
- Molecular inversion probes
 - HaloPLEX

Cílený screening

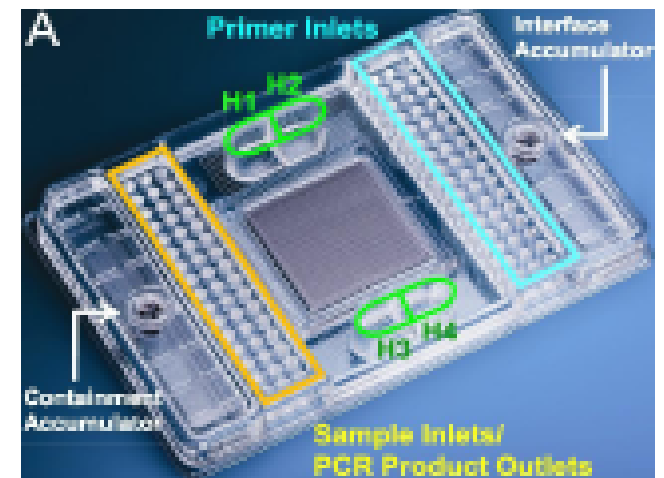
Exome sequencing

Všechny exprimované geny
Většinou včetně nekódujících
Hybridizace (v roztoku)

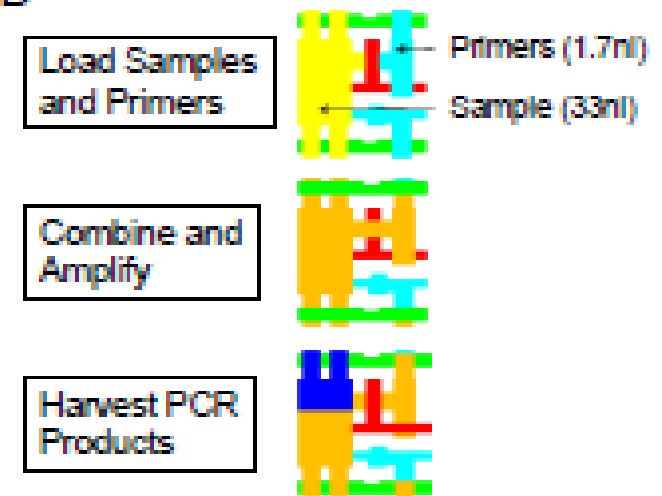
Gene enrichment

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

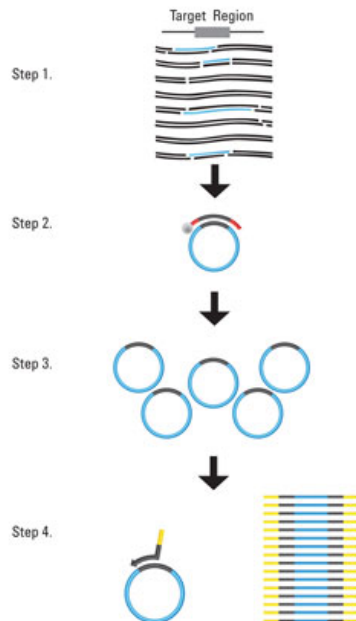
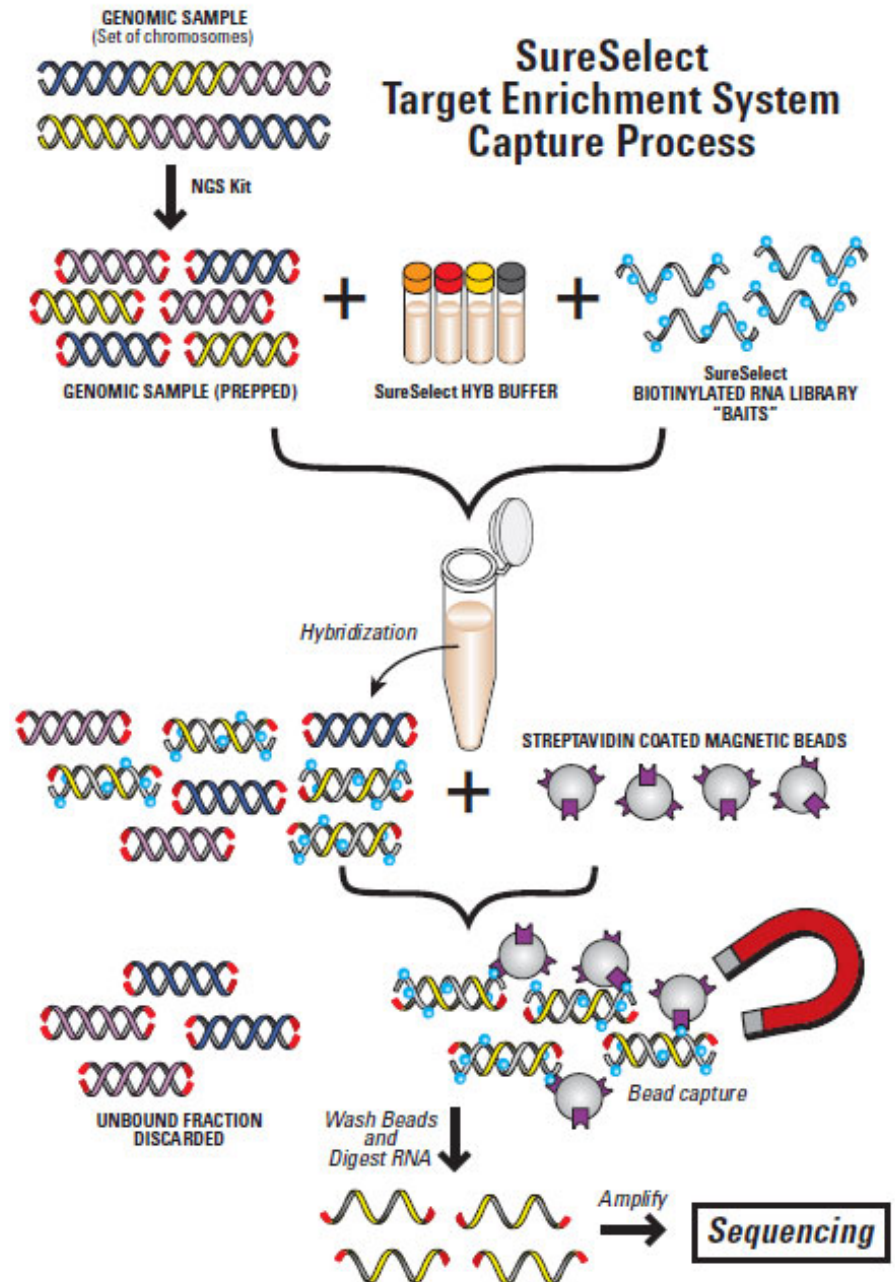


Figure 1. HaloPlex workflow.



PCR enrichment – (masivně) paralelní PCR

Fluidigm AccessArray

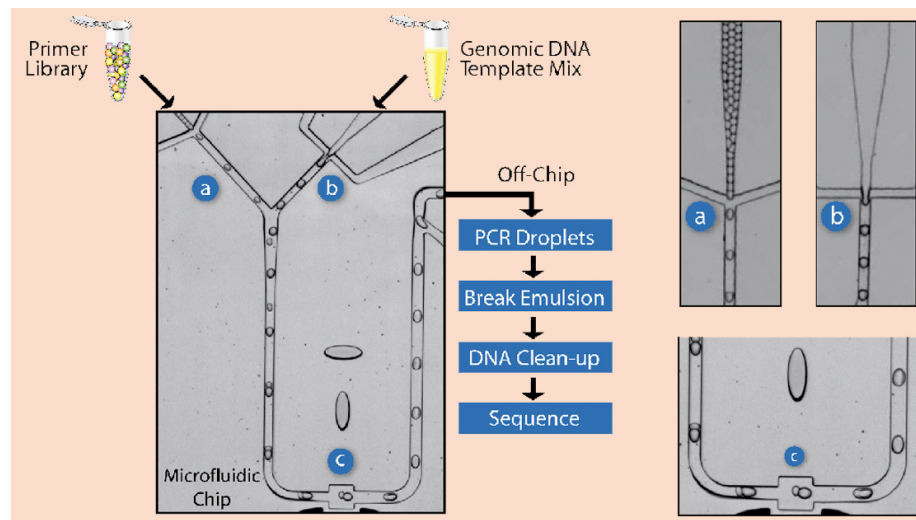
48x48 reakcí, objem 10nL

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

Oxford Nanopore 1D knihovny

