



Technologie sekvenování

- Sekvenování (sequencing) stanovení pořadí nukleotidů v molekule DNA - primární struktura

Důvody řešení genomových projektů

- ◆ Genomika modelových organismů (*de novo* sekvenování)
- ◆ Analýza mutací a SNP, výzkum genetických onemocnění (resekvenování genomů, varianty sekvencí)
- ◆ Diagnostika a identifikace (*de novo* sekvenování a resekvenování)
- ◆ Analýza transkriptomu (RNAseq)
- ◆ Analýza malých RNA: miRNAs, siRNA, piRNA, (small RNA seq)
- ◆ Metagenomika (16S rRNA, celé metagenomy)
- ◆ DNA metylační studie (medip-seq, bisulfite treated DNA)
- ◆ Studie interakcí protein - DNA (ChIPseq)

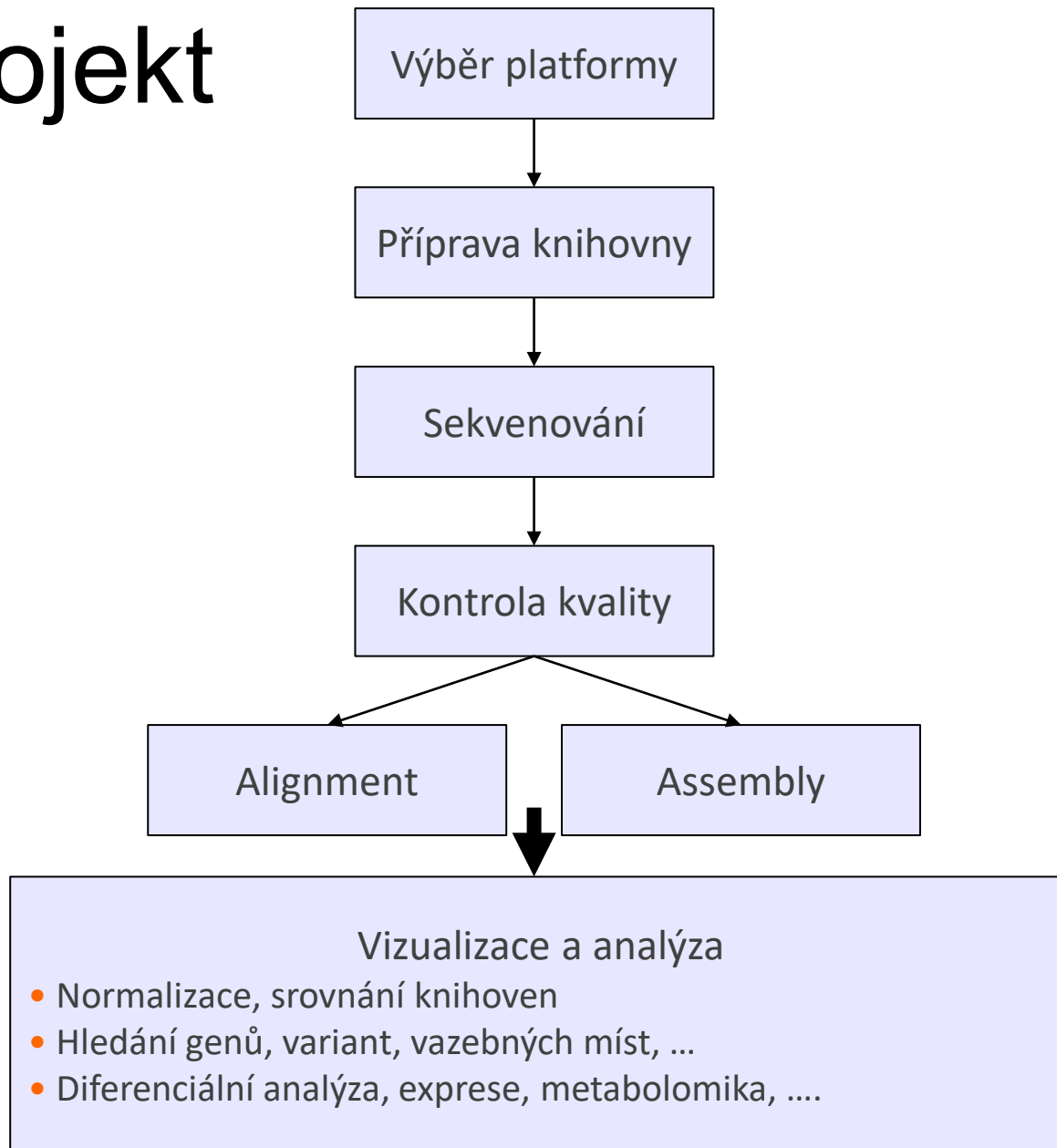
Techniky sekvenování

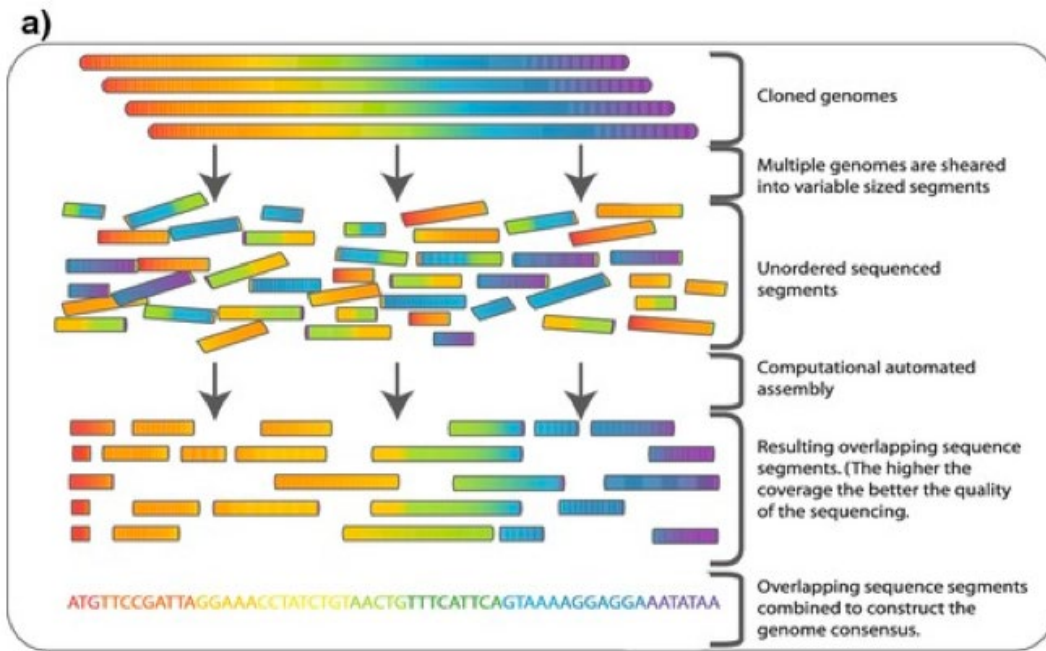
- Klasické techniky:
 - Chemická (Maxamova-Gilbertova)
 - Již se nepoužívá
 - **Enzymová (Sangerova)**
 - V současnosti se používá automatická varianta
- Metody sekvenování nové generace (next generation sequencing, NGS)
 - **Illumina, IonTorrent, (454, SoLiD)**
- Metody sekvenování třetí generace
 - **PacBio, NanoPore, (Helicos)**

Princip sekvenačních metod

- **Klasické Sangerovo sekvenování kapilární elektroforézou**
 - Vyžaduje velký počet kopií vstupního materiálu DNA jako templátu pro přípravu jednořetězců
- **Sekvenování nové generace**
 - Jako templát slouží jediná molekula, která je amplifikována pro získání dostatečného signálu, produkuje **krátká** čtení, možnost kvantitativní analýzy (SNP)
- **Sekvenování třetí generace**
 - Jako templát slouží jediná molekula. Nevyužívá amplifikace za účelem zvýšení signálu, produkuje **dlouhá** čtení

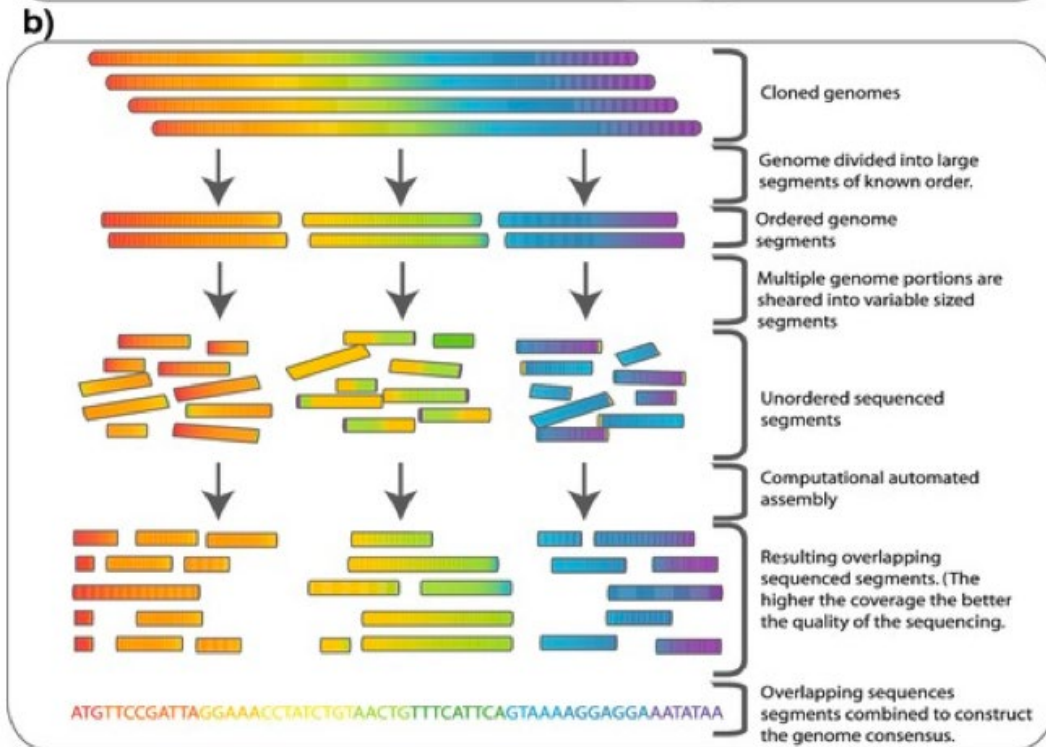
Projekt





Celogenomové
shotgun (náhodné)
sekvenování

versus



postupné shot-gun
sekvenování

Technické požadavky pro úspěšné stanovení sekvence

- ❖ **Příprava knihovny pro sekvenování**
molekuly s přesně definovanými konci
 - s místem pro vazbu primeru
 - s koncovou značkou
 - **Zajistit dostatečné pokrytí při čtení genomu**
- ❖ **Příprava variant fragmentů ssDNA lišících se svou délkou o jeden nukleotid**
 - Syntéza
 - Degradace
- ❖ **Detekce těchto variant fragmentů**
 - Přesná separace na základě jejich délky
 - Detekce připojené koncové báze
- **Kontinuální čtení**

Postup enzymatického sekvenování DNA

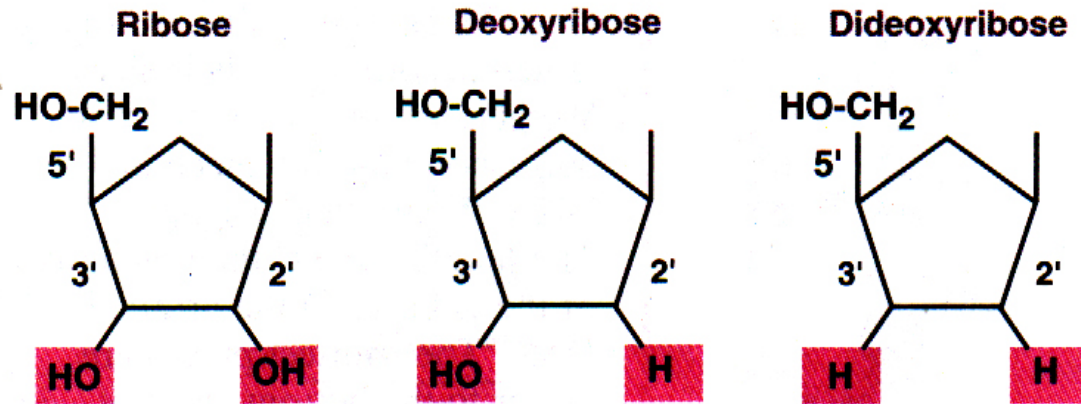
1. Příprava ssDNA jejíž sekvence má být stanovena
2. Rozdělení do 4 vzorků
3. Reakce s DNA polymerázou při níž se začlení do syntetizované DNA místo normálního deoxyribonukleosidtrifosfátu jeho analog, který působí jako koncový inhibitor syntézy DNA - dideoxynukleosidtrifosfát (ddNTP). V každém ze 4 vzorků vzniknou fragmenty, které jsou zakončeny příslušným ddNTP (ddCTP, ddGTP, ddATP a ddTTP).

Reakce obsahuje:

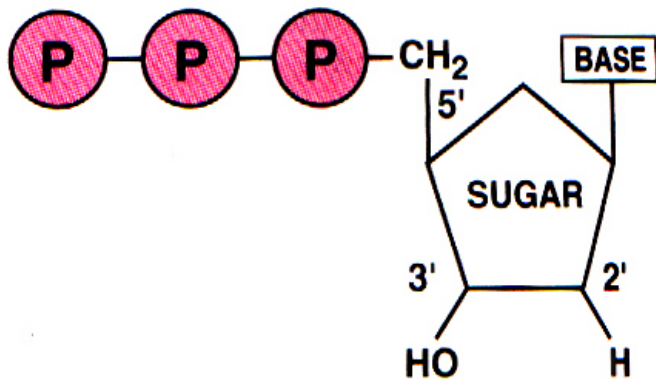
- molekulu DNA
- značený primer při pojující se k části molekuly DNA (místo odkud začínáme stanovovat sekvenci)
- směs obsahující 4 normální nukleotidy
- jeden ddNTP (v každém ze 4 vzorků je jiný)
- DNA polymerázu

4. Denaturace produktů
5. Elektroforetická separace umožňující oddělení fragmentů lišících se délkou o jednu bázi
6. Detekce fragmentů, které nesou označený konec

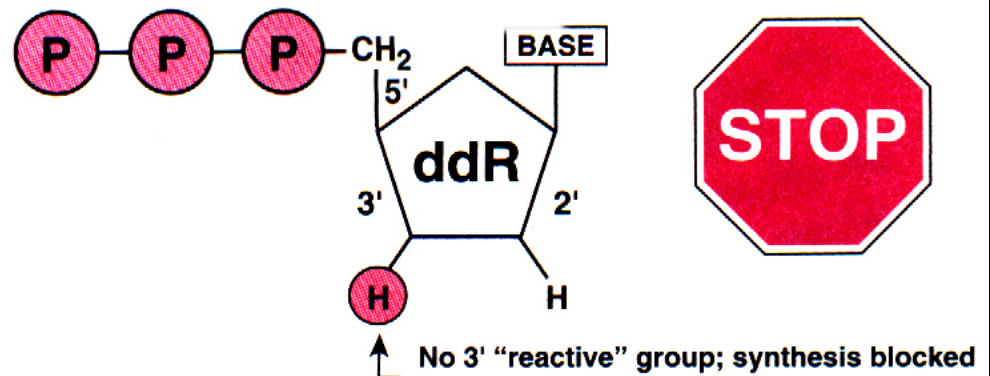
Dideoxynukleotidy nemají hydroxyl na 3'-konci



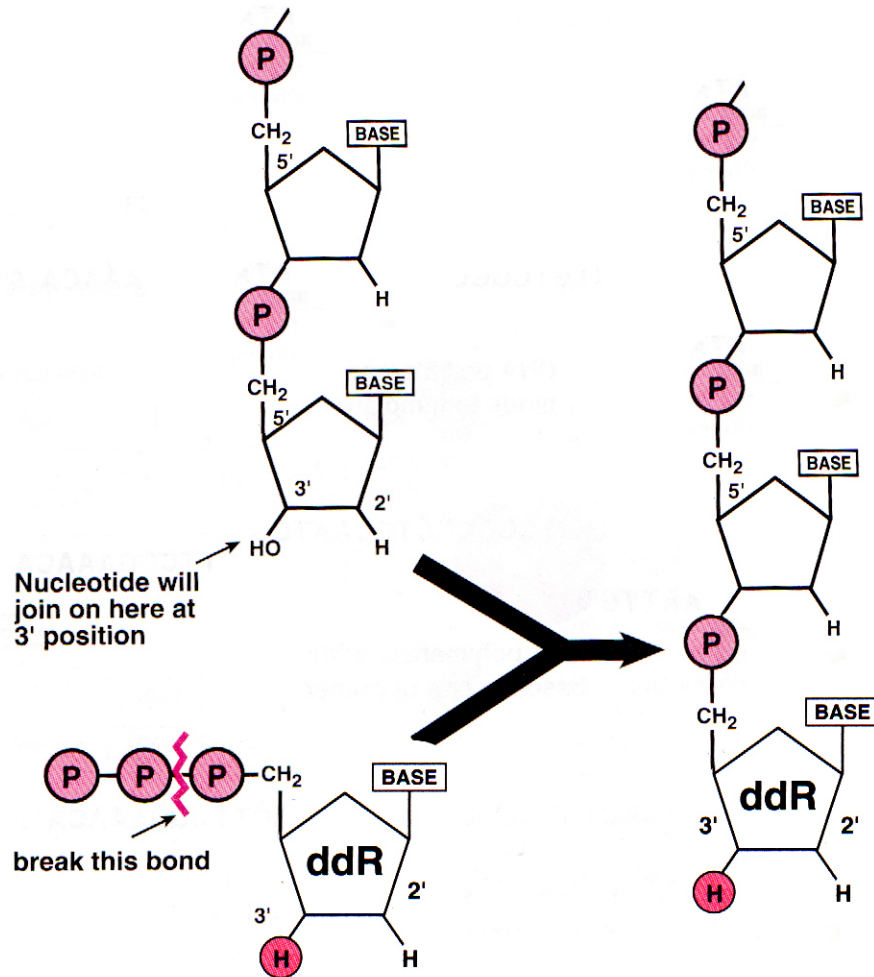
23.4 DEOXYNUCLEOSIDE TRIPHOSPHATE



23.7 DIDEOXYRIBOSE BLOCKS ELONGATION



Pokud je dideoxynukleotid inkorporován do syntetizujícího se řetězce, působí jako terminátor reakce



Replikace DNA s normálními deoxynukleotidy

Původní sekvence

A G C C T G G C G A C C A T C G T
T C G G A C C G C T G G T A G C A

Denaturovaný templátový řetězec

3' A G C C T G G C G A C C A T C G T 5'

Prfektní kopie

A G C C T G G C G A C C A T C G T
T C G G A C C G C T G G T A G C A

Co se stane pokud při reakci použijete směs dGTP a ddGTP?

Původní sekvence

A G C C T G G C G A C C A T C G T
T C G G A C C G C T G G T A G C A

Templátový řetězec

3' A G C C T G G C G A C C A T C G T 5'

Perfektní kopie

~~A G C C T G G C G A C C A T C G T
T C G G A C C G C T G G T A G C A~~

Směs řetězců ukončených GUANINEM
při použití směsi dGTP a ddGTP

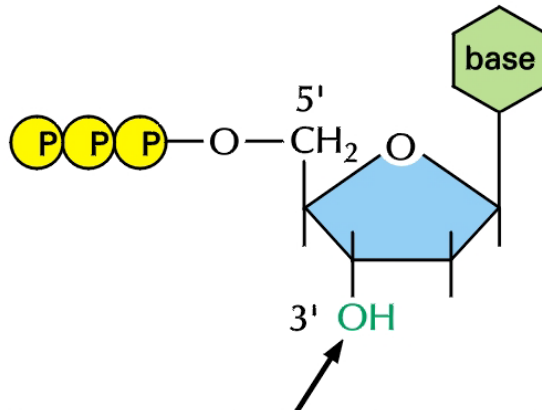
T C G
T C G G
T C G G A C C G
T C G G A C C G C T G
T C G G A C C G C T G G
T C G G A C C G C T G G T A G

Enzymová metoda sekvenování DNA (Sanger)

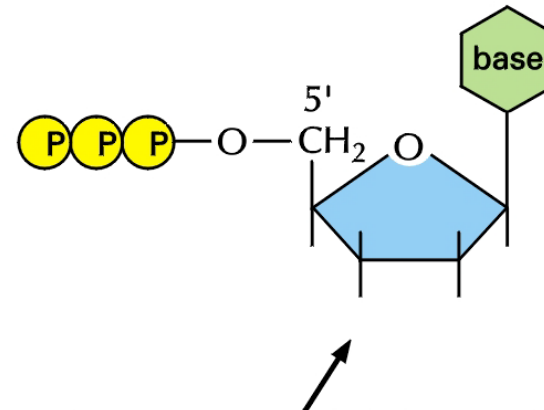
(A)

deoxyribonukleosidtrifosfát

dideoxyribonukleosidtrifosfát



je možno prodloužit řetězec na 3' -konci

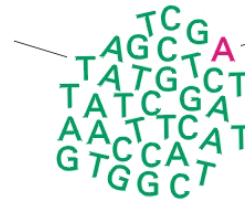


není možno prodloužit řetězec na 3' -konci

(B)

normální prekursori
deoxyribonukleosidtrifosfátů (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

malé množství jednoho
dideoxyribonukleosidtrifosfátu (ddATP)



oligonukleotidový primer
pro DNA-polymerázu



vzácná inkorporace
dideoxyribonukleosidtrifosfátu
DNA-polymerázou zastaví další
růst molekuly DNA

jednořetězcová DNA,
která bude sekvenována

(C)

5' GCATATGTCAGTCCAG 3'
3' CGTATACAGTCAGGTC 5' } dvouřetězcová DNA

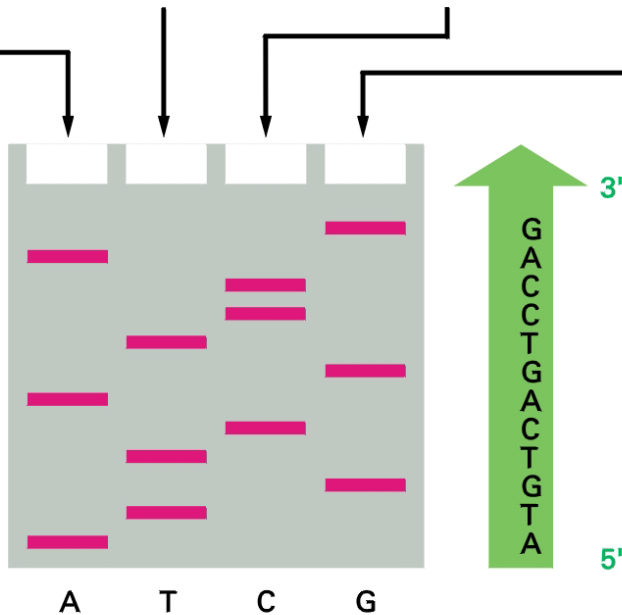
označený primer

5' GCAT 3'
3' CGTATACAGTCAGGTC 5' } jednořetězcová DNA

+ nadbytek dATP
dTTP
dCTP
dGTP

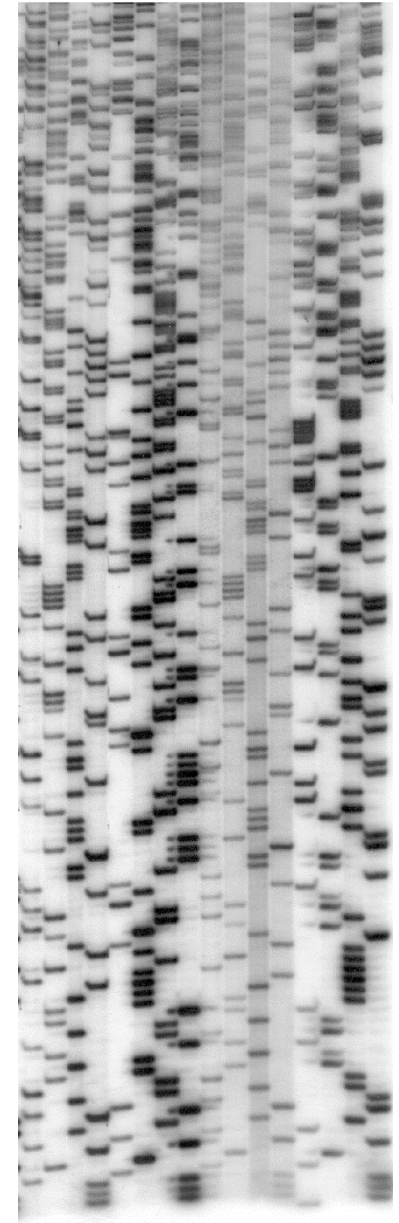
+ ddATP + DNA-polymeráza + ddTTP + DNA-polymeráza + ddCTP + DNA-polymeráza + ddGTP + DNA-polymeráza

GCAT A GCAT AT GCAT ATGTC GCAT ATG
GCAT ATGTCA GCAT ATGT GCAT ATGTCAGTC GCAT ATGTCAG
GCAT ATGTCAGTCCA GCAT ATGTCAGT GCAT ATGTCAGTCC GCAT ATGTCAGTCCAG



[seq4.mov](#)

Obraz autoradiogramu ze sekvenačního gelu



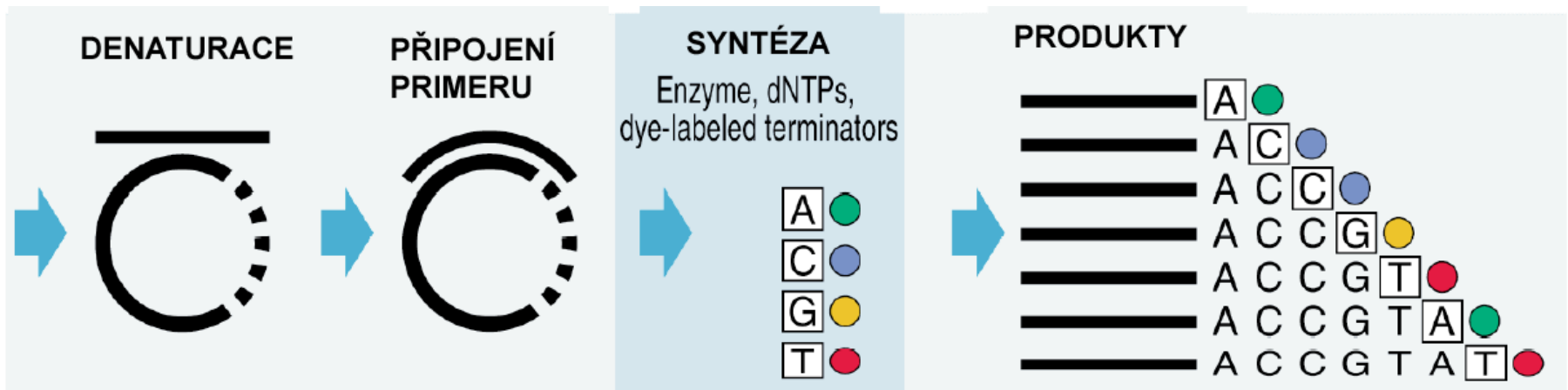
ATGC ATGC ATGC ATGC

Automatické sekvenování DNA

- Je variantou enzymatického sekvenování DNA.
- Syntéza DNA probíhá v jedné reakci
- Ke značení produktů se používají čtyřmi různými fluorescenčními značkami označené dideoxyribonukleotidy

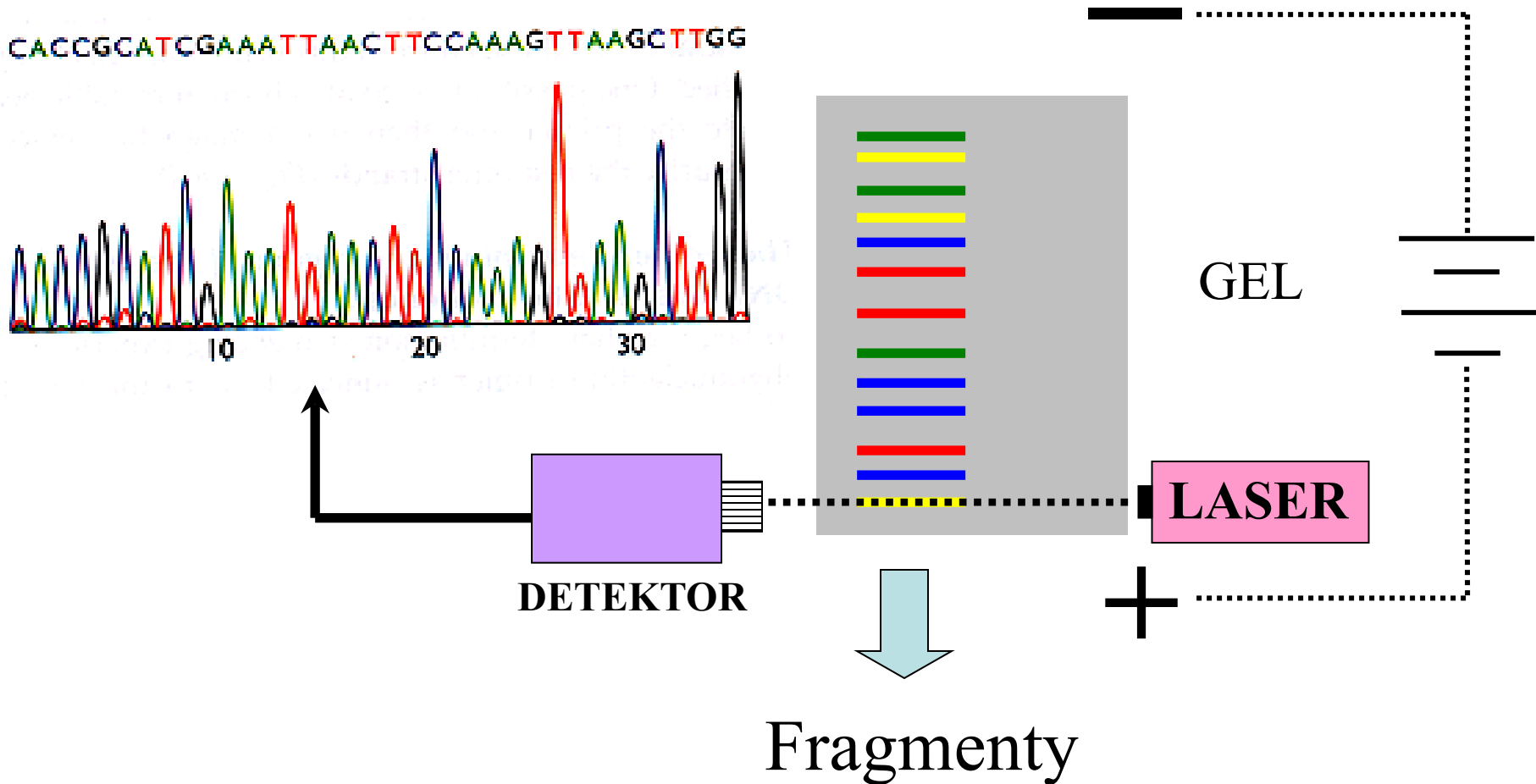
Strategie barevných terminátorů

asymetrická PCR



Princip detekce produktů

- Detekce produktů probíhá během elektroforézy pomocí laserového detektoru (laserem indukovaná fluorescence, LIF) napojeného na počítač, který vyhodnocuje sekvenci.



Genetický analyzátor ABI 3100

Soustava
kapilár

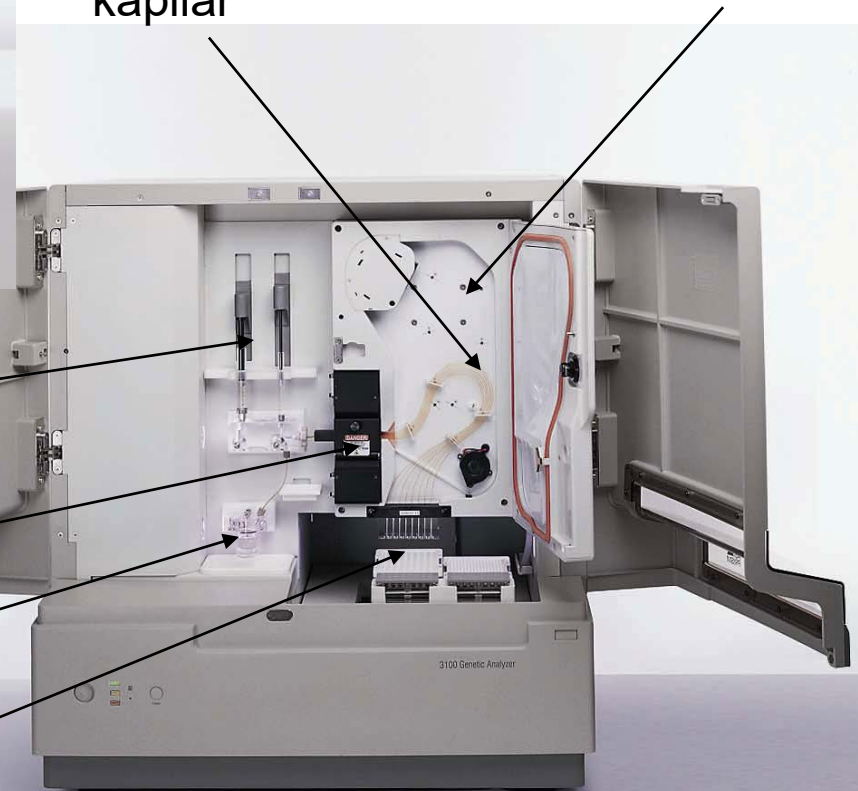
Vyhřívaná deska

Příprava gelu

Laserový detektor

Rezervoár pufru

Automatické nanášení vzorku



Příprava knihovny pro náhodné sekvenování genomů

- Při náhodném sekvenování genomu jsou nejdříve připraveny mechanickým stříháním genomové DNA fragmenty s optimální velikostí (1 300 – 2 000 bp) a po úpravě jejich konců jsou nahodile naklonovány do vhodného vektoru za vzniku velkého počtu klonů.
- Ke štěpení DNA se využívá sonikace nebo pankreatická DNáza I za přítomnosti Mn^{2+} .

Příprava knihovny pro Sangerovo sekvenování



Izolace DNA



Fragmentace 1300 – 2000 bp

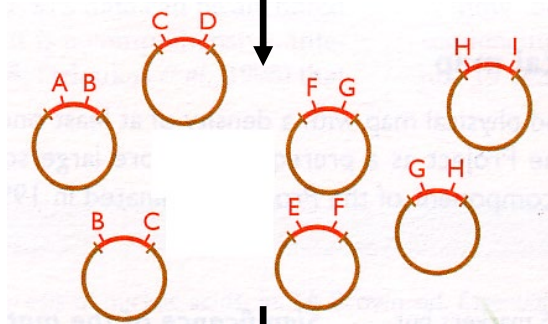


+



Vektor

Úprava konců a klonování

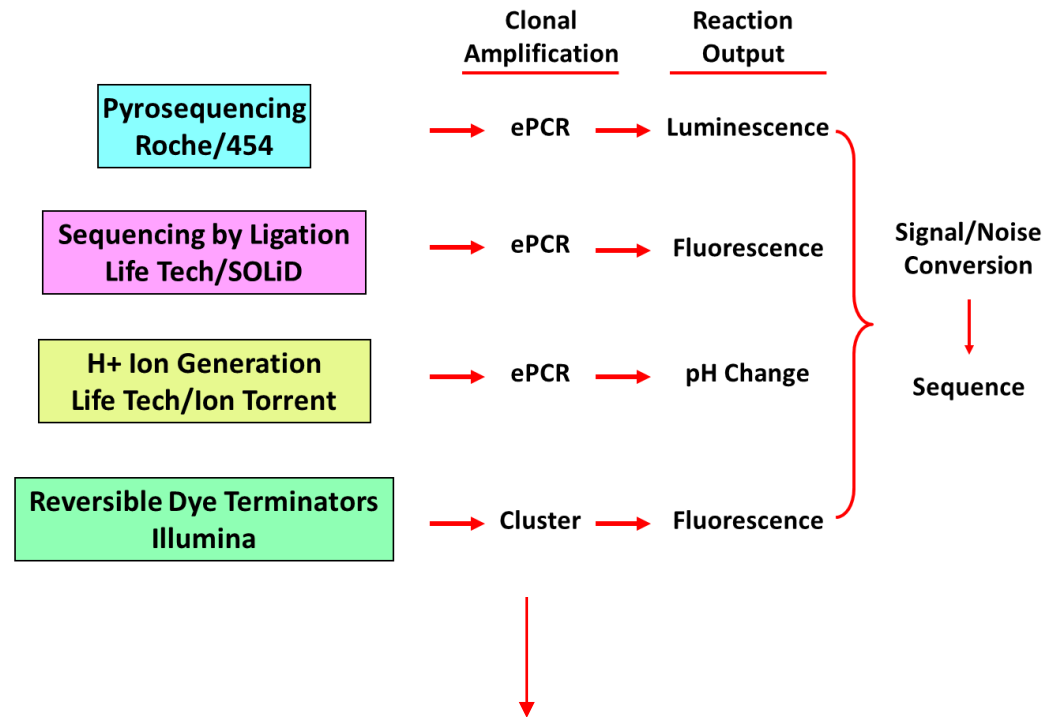


Sestavení překrývajících se klonů



Metody sekvenování nové generace (next generation sequencing, NGS)

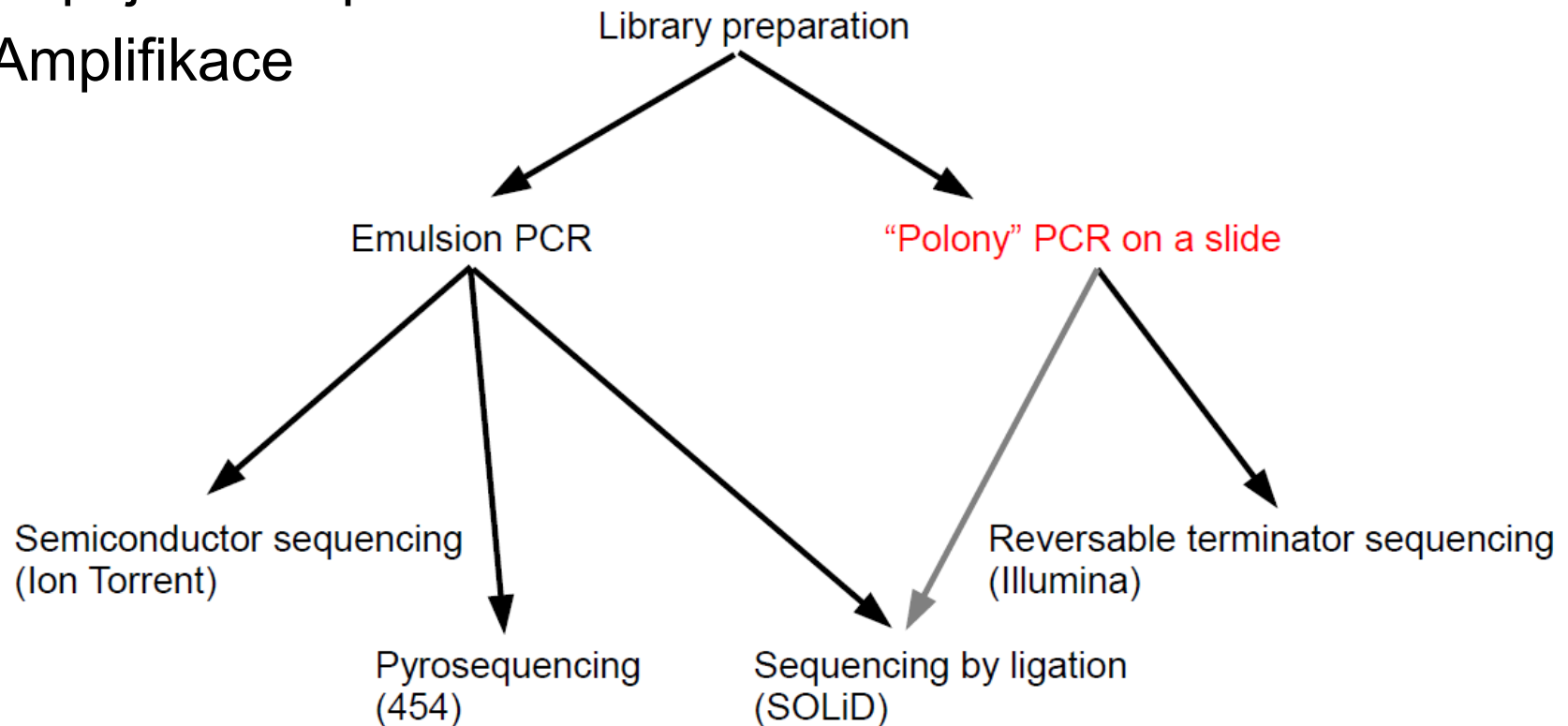
- Krátká čtení - liší se v provedení a chemii
- V základu se podobají v sekvenování tisíců až miliónů klonálně amplifikovaných molekul (masivní paralelní sekvenování)
- Probíhá vývoj technik
 - Více čtení
 - Delší čtení
 - Rychlejší sekvenování
 - Nižší cena
- Možnost kvantifikace
- Možnost multiplexování



- **Sekvenování třetí generace**
 - Pacific Biosciences (PacBio)
 - Oxford Nanopore Technologies
 - Helicos Biosciences

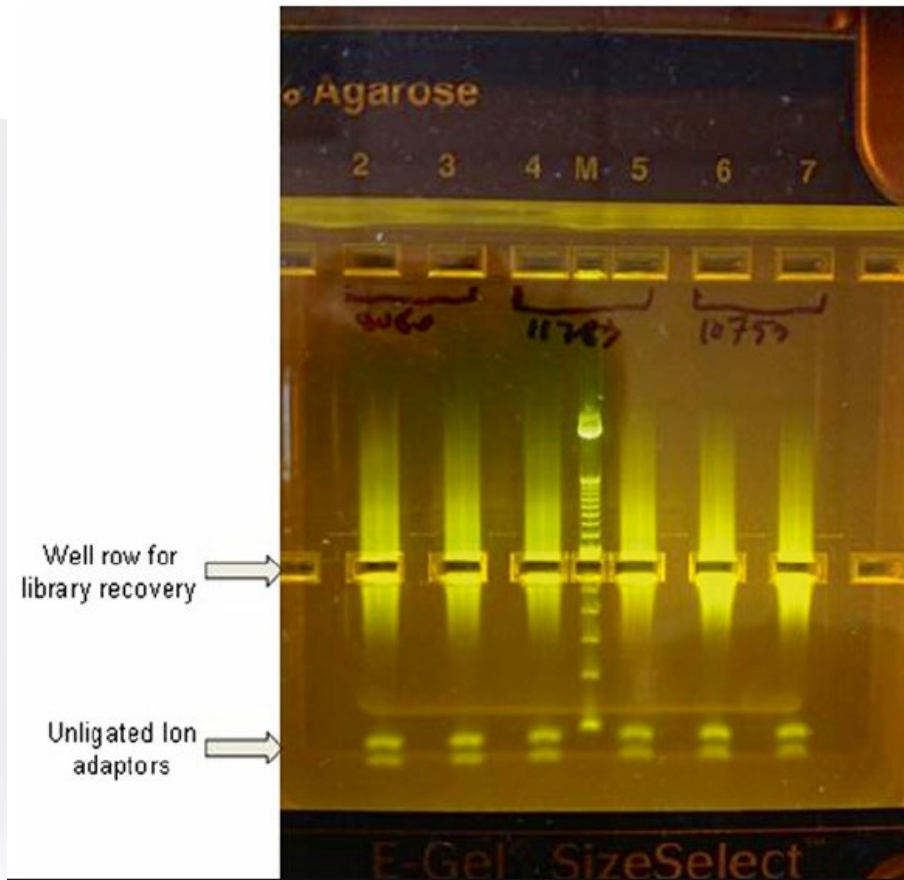
Metody přípravy knihovny

- Fragmentace
 - Enzymatická
 - Fyzikální (sonikace, nebulizace, Hydroshear)
- Připojení adaptorů
- Amplifikace

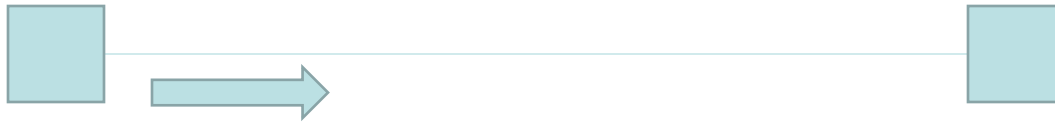


Selekcce fragmentů podle velikosti

- E-gel System



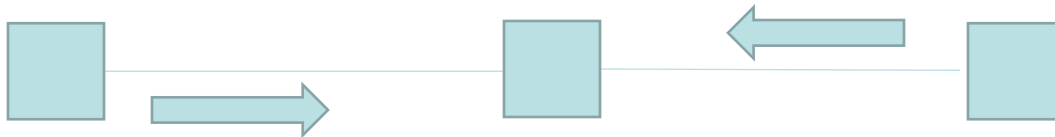
Typy uspořádání NGS sekvenování



Single Read



Paired-end read (PE)

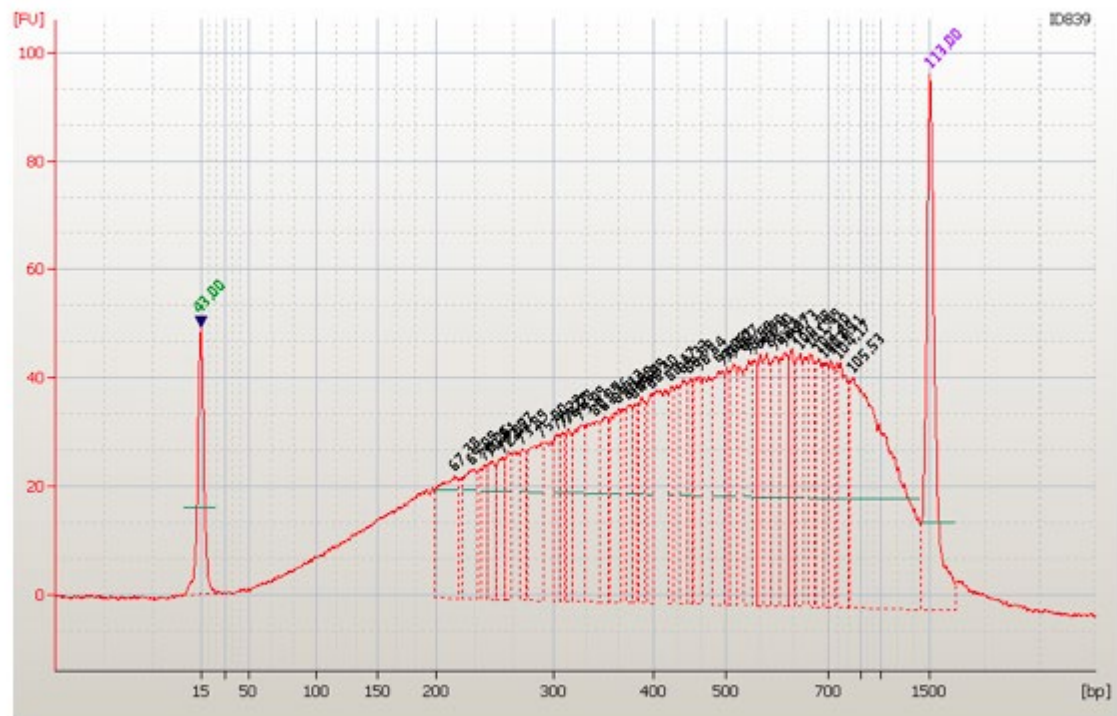
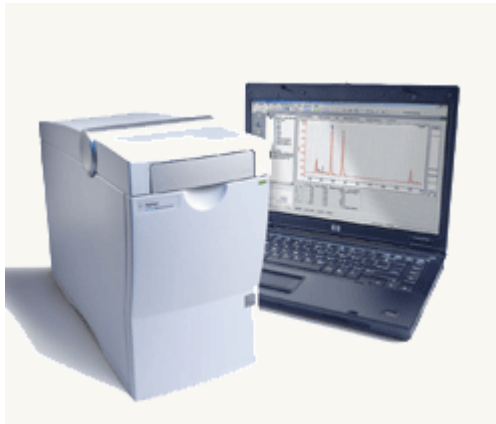


Mate-pair read (MP)

výsledkem jsou miliony krátkých čtení sekvencí z náhodných částí genomu

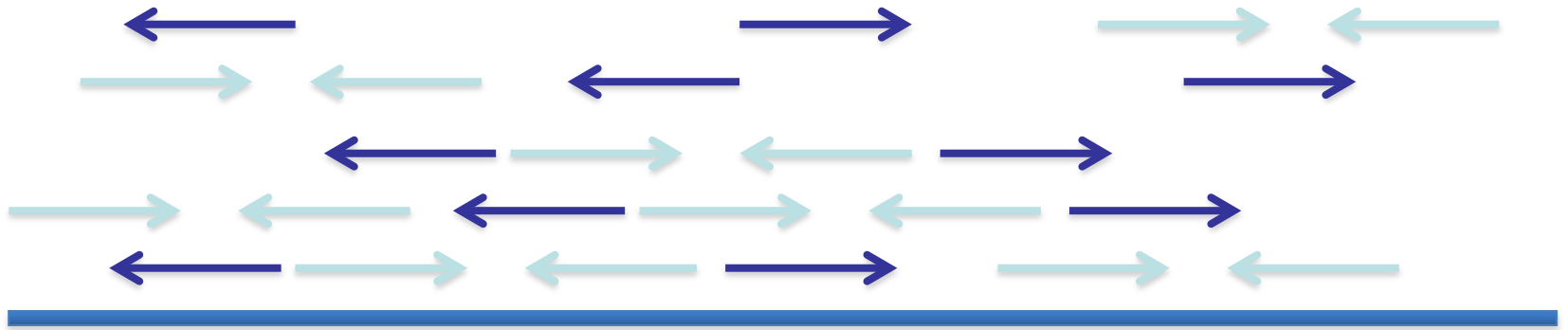
Analýza velikostí fragmentů knihovny na Agilent bioanalyzátoru

Post Shear



Agilent Bioanalyzer image of Sheared DNA. X axis = base pairs

Orientace párových čtení



Paired end (PE) reads



PE, MP

Mate pair (MP) reads



MP

Hloubka sekvenování (pokrytí)

- Coverage (pokrytí) = (počet získaných čtení × průměrná délka čtení)/velikost genomu
- Fragment 2000 bází sestavíme z 8 čtení o délce 500 bp -> $8 \times 500 / 2000 = 2$
- Příklad 1: Získali jsme 10^6 čtení s technologií IonTorrent, velikost genomu je 3 Mb. Jaké je pokrytí?
- Příklad 2: Technologie Illumina poskytuje 200 milionů čtení. Kolik genomů o velikosti 5 Mb mohou sekvenovat, abych získal pokrytí 50×?

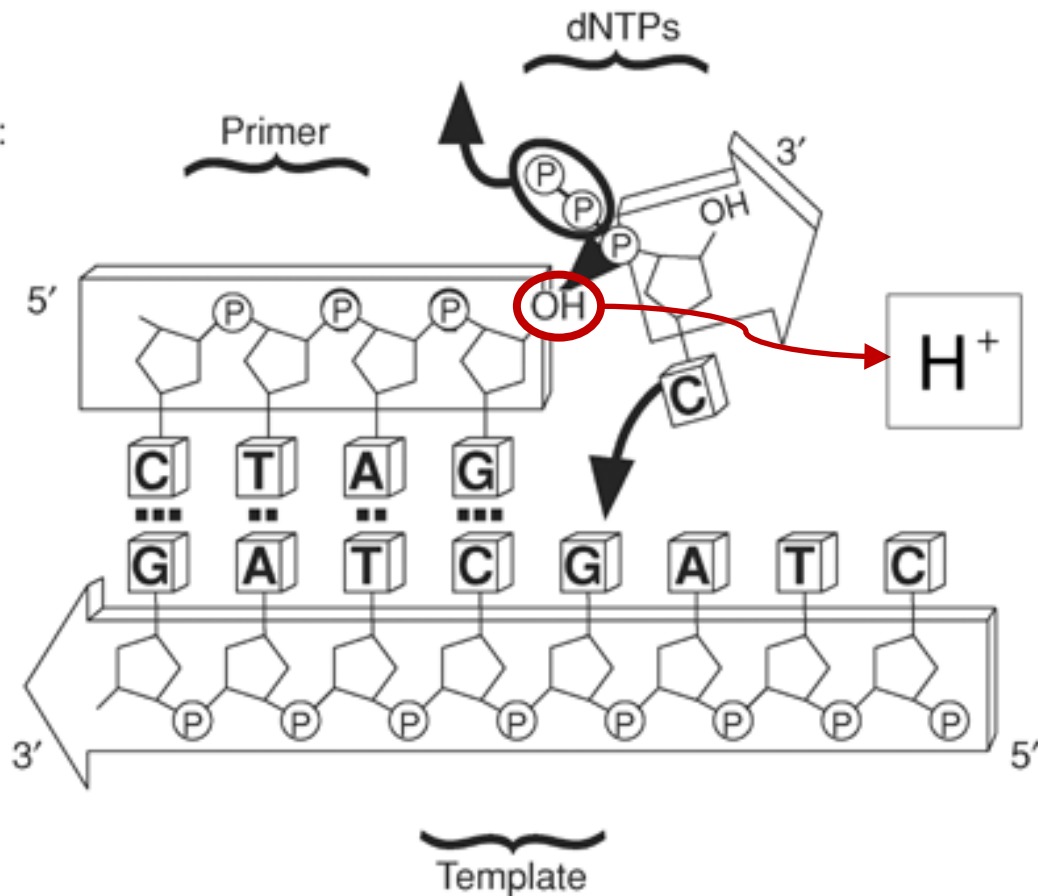
Ion Torrent polovodičové sekvenování

- Nástupce pyrosekvenování (454-sekvenování)
- prvním platforma, která **nepoužívá pro detekci sekvenovaných bází DNA světelný signál, který by byl uvolňovaný při enzymatických reakcích s fluorescenčními nebo chemiluminescenčními substráty**
- Sekvenování Ion Torrent je založené na elektrochemické detekci vodíkových iontů (pH) které jsou uvolněny při replikaci sekvenovaného templátu na speciálním polovodičovém čipu.

Uvolnění vodíku v nepufřujících podmínkách

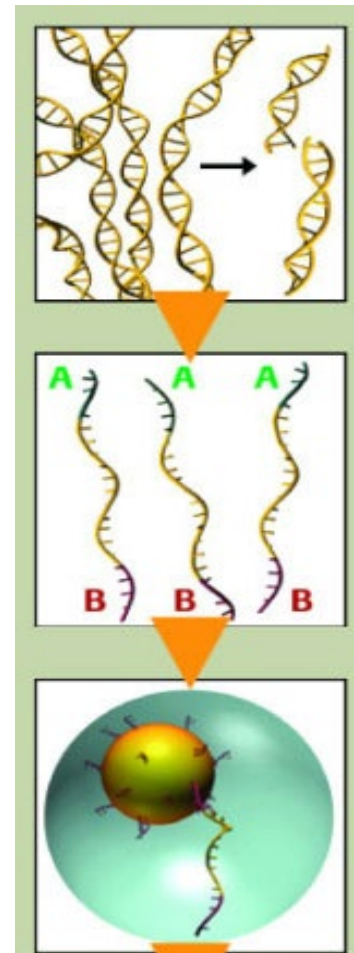


Example:

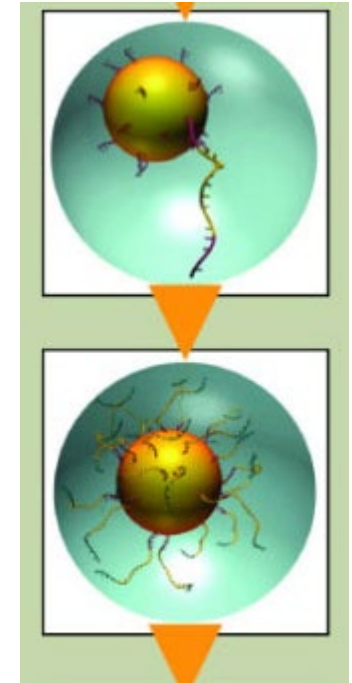


Příprava knihovny při emulzní PCR

- Příprava jednořetězcové DNA knihovny
 - Umožňuje zpracovat různé typy vzorků
 - genomové DNA
 - produkty PCR
 - klonované DNA
 - metagenom
 - Frakcionace dlouhých úseků na 200- až 400-bp dlouhé fragmenty
 - Vazba dvou adaptorů specifických pro 3'- a 5'-konce na každý fragment
 - Adaptor A obsahuje vazebné místo pro primer
 - Adaptor B obsahuje 5'-biotinovou značku, která slouží k imobilizaci DNA knihovny na mikrosféry pokryté streptavidinem



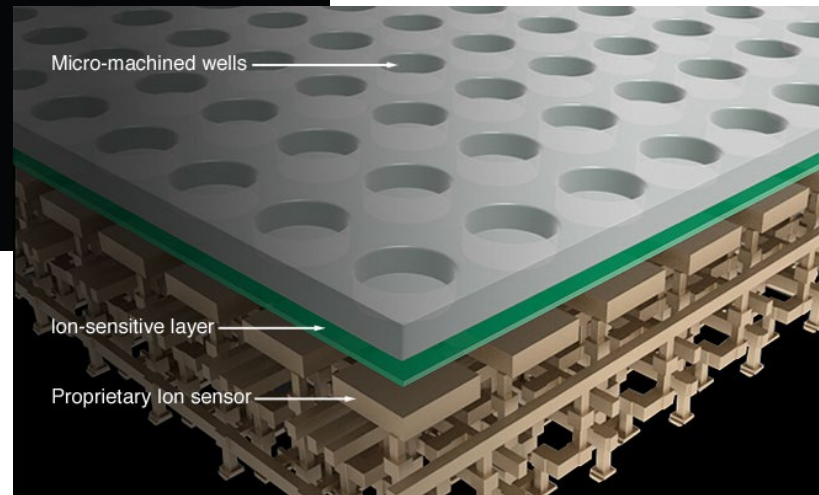
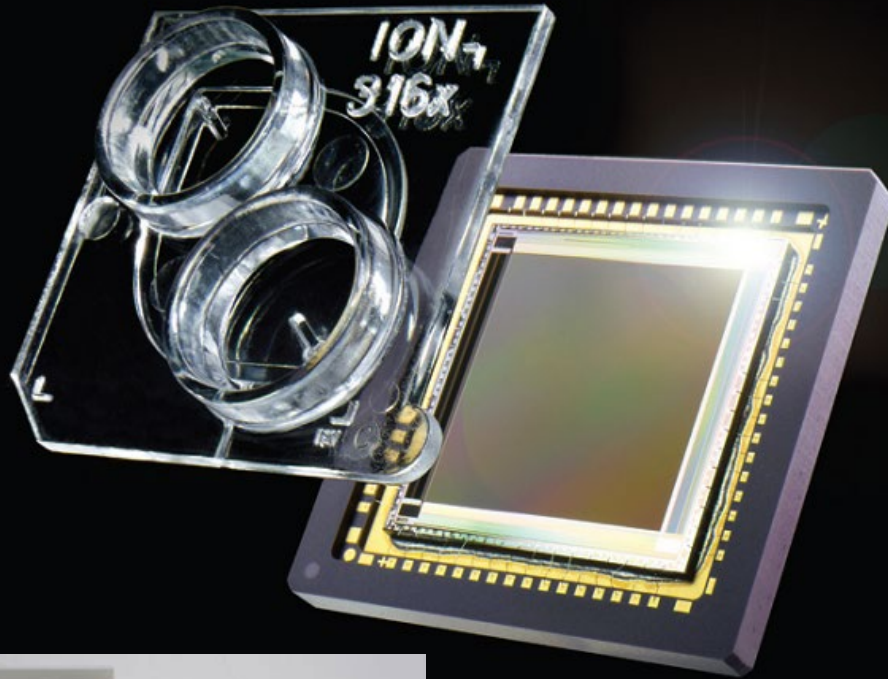
- Klonální amplifikace knihovny
 - **emulzní PCR**, amplifikační reagensie ve směsi voda-olej → mikroreaktory obsahující jedinou kuličku s unikátním fragmentem DNA z knihovny - (10^7) kopií
- Separace kuliček a výběr pouze těch, které obsahují amplifikovanou DNA (enrichment)
- Sekvenační reakce
- Analýza dat a assembly



IonTorrent polovodičové sekvenování

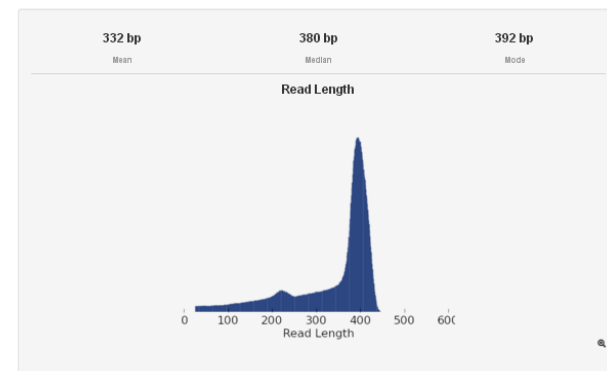
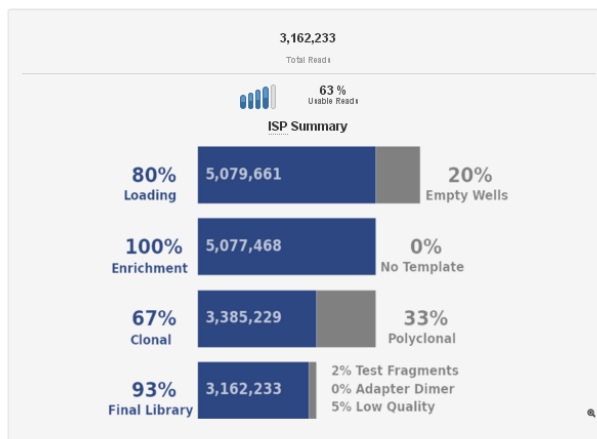
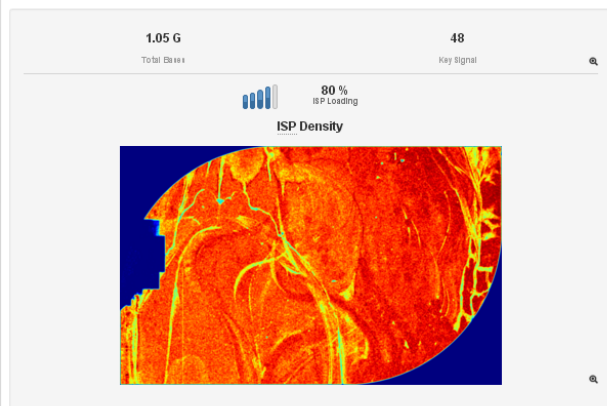
- Na čipu se nachází milióny jednotlivých reakčních cell (reaktorů), ve kterých probíhá sekvenační analýza individuálních kopií DNA na základě kontinuálního střídání reakčních složek (jednotlivých typů nukleotidů) v mikrofluidním systému.
- DNA imobilizovaná na mikrosférách (po emulzní PCR)
- Kapacita závisí na typu použitého polovodičového chipu
 - 10 – 65 miliónů
 - 100 – 600 miliónů
 - > 1000 miliónů

IonTorrent čip

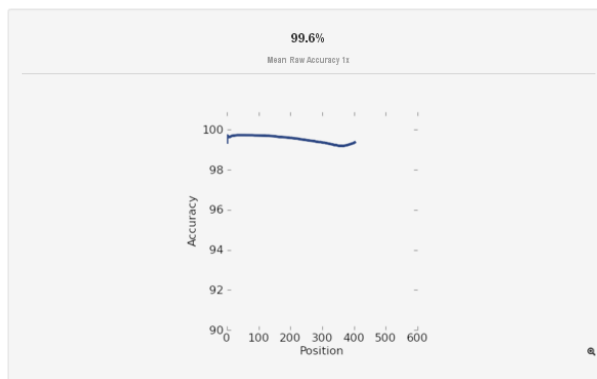
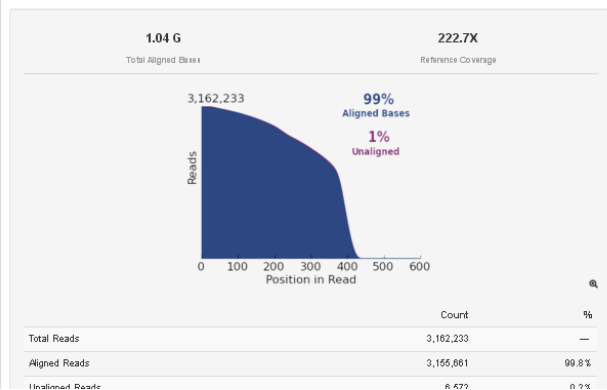


Výstup z Torrent server

Read Summary: Unaligned



Aligned to E. coli DH10B



1.03 G AQ17 Total Bases

Alignment Quality

	AQ17	AQ20	Perfect
Total Number of Bases [bp]	1.03 G	1 G	780 M
Mean Length [bp]	332	325	259
Longest Alignment [bp]	499	499	472
Mean Coverage Depth [x]	220.3	213.8	166.4

Alignment & Variant Calling

Aplikace Místa System Ct, 24. květen, 15:47 LMDM

GS De novo Assembler

Project: Stafal [Genomic] Ready for analysis

Location: /home/LMDM/Plocha/analyza/Stafal

Overview Project Parameters Result files Alignment results **Flowgrams**

Contig	Bases
contig00001	20 149
contig00002	18 049
contig00003	14 160
contig00004	11 926
contig00005	8 637
contig00006	7 994
contig00007	6 816
contig00008	6 697
contig00009	4 476
contig00010	3 326
contig00011	3 095
contig00012	3 014
contig00013	2 722
contig00014	2 690
contig00015	2 383
contig00016	2 329
contig00017	2 191
contig00018	2 036
contig00019	1 499
contig00020	1 352
contig00021	1 166
contig00022	1 050
contig00023	1 016
contig00024	948
contig00025	770

Contig: contig00001 - 20 149 bp.

Base left selected right

2 032 --- 2 132

contig00001 TCTTCTCCTAAAAACC-TAAAGTATCAAGG-TTTTT-ACAAACCTCTACATT-AGGTAAGT-AACCGAAAGGTTCTATACTAGAACTGTATATAAACTATTTGT
HK6IEBF01BN89B TCTTCTCCTAAAAACC-TAAAGTATCAAGG-TTTTT-ACAAACCTCTACATT-AGGTAAGT-AACCGAAAGGTTCTATACTAGAACTGTATATAAACTATTTGT
contig00007 HK6IEBF01ARRSN TCTTCTCCTAAAAACC-TAAAGTATCAAGG-TTTTT-ACAAACCTCTACATT-AGGTAAGT-AACCGAAAGGTTCTATACTAGAACTGTATATAAACTATTTGT
HK6IEBF01A3HAV TCTTCTCCTAAAAACC-TAAAGTATCAAGG-TTTTT-ACAAACCTCTACATT-AGGTAAGT-AACCGAAAGGTTCTATACTAGAACTGTATATAAACTATTTGT
contig00008 HK6IEBF01BHKX2 TCTTCTCCTAAAAACC-TAAAGTATCAAGG-TTTTT-ACAAACCTCTACATT-AGGTAAGT-AACCGAAAGGTTCTATACTAGAACTGTATATAAACTATTTGT
contig00009 HK6IEBF01A5THI TCTTCTCCTAAAAACC-TAAAGTATCAAGG-TTTTT-ACAAACCTCTACATT-AGGTAAGT-AACCGAAAGGTTCTATACTAGAACTGTATATAAACTATTTGT
contig00010 HK6IEBF01AHUA1 TCTTCTCCTAAAAACC-TAAAGTATCAAGG-TTTTT-ACAAACCTCTACATT-AGGTAAGT-AACCGAAAGGTTCTATACTAGAACTGTATATAAACTATTTGT
HK6IEBF01A9E9P TCTTCTCCTAAAAACC-TAAAGTATCAAGG-TTTTT-ACAAACCTCTACATT-AGGTAAGT-AACCGAAAGGTTCTATACTAGAACTGTATATAAACTATTTGT
contig00011 HK6IEBF01BKM7X TCTTCTCCTAAAAACC-TAAAGTATCAAGG-TTTTT-ACAAACCTCTACATT-AGGTAAGT-AACCGAAAGGTTCTATACTAGAACTGTATATAAACTATTTGT
contig00012 HK6IEBF01AV175 TCTTCTCCTAAAAACC-TAAAGTATCAAGG-TTTTT-ACAAACCTCTACATT-AGGTAAGT-AACCGAAAGGTTCTATACTAGAACTGTATATAAACTATTTGT
contig00013 HK6IEBF01BJY8L TCTTCTCCTAAAAACC-TAAAGTATCAAGG-TTTTT-ACAAACCTCTACATT-AGGTAAGT-AACCGAAAGGTTCTATACTAGAACTGTATATAAACTATTTGT
contig00014 HK6IEBF01BBYUP TCTTCTCCTAAAAACC-TAAAGTATCAAGG-TTTTT-ACAAACCTCTACATT-AGGTAAGT-AACCGAAAGGTTCTATACTAGAACTGTATATAAACTATTTGT
contig00015 HK6IEBF01AI6AG TCTTCTCCTAAAAACC-TAAAGTATCAAGG-TTTTT-ACAAACCTCTACATT-AGGTAAGT-AACCGAAAGGTTCTATACTAGAACTGTATATAAACTATTTGT
contig00016 HK6IEBF01AW7YG TCTTCTCCTAAAAACC-TAAAGTATCAAGG-TTTTT-ACAAACCTCTACATT-AGGTAAGT-AACCGAAAGGTTCTATACTAGAACTGTATATAAACTATTTGT
contig00017 HK6IEBF01B1E6 TCTTCTCCTAAAAACC-TAAAGTATCAAGG-TTTTT-ACAAACCTCTACATT-AGGTAAGT-AACCGAAAGGTTCTATACTAGAACTGTATATAAACTATTTGT
contig00018 HK6IEBF01AYV3H TCTTCTCCTAAAAACC-TAAAGTATCAAGG-TTTTT-ACAAACCTCTACATT-AGGTAAGT-AACCGAAAGGTTCTATACTAGAACTGTATATAAACTATTTGT
contig00019 HK6IEBF01BN288 TCTTCTCCTAAAAACC-TAAAGTATCAAGG-TTTTT-ACAAACCTCTACATT-AGGTAAGT-AACCGAAAGGTTCTATACTAGAACTGTATATAAACTATTTGT
HK6IEBF01BG5KV TCTTCTCCTAAAAACC-TAAAGTATCAAGG-TTTTT-ACAAACCTCTACATT-AGGTAAGT-AACCGAAAGGTTCTATACTAGAACTGTATATAAACTATTTGT
contig00020 HK6IEBF01BFFDR TCTTCTCCTAAAAACC-TAAAGTATCAAGG-TTTTT-ACAAACCTCTACATT-AGGTAAGT-AACCGAAAGGTTCTATACTAGAACTGTATATAAACTATTTGT
HK6IEBF01B04U2 TCTTCTCCTAAAAACC-TAAAGTATCAAGG-TTTTT-ACAAACCTCTACATT-AGGTAAGT-AACCGAAAGGTTCTATACTAGAACTGTATATAAACTATTTGT
contig00021 HK6IEBF01A39J2 TCTTCTCCTAAAAACC-TAAAGTATCAAGG-TTTTT-ACAAACCTCTACATT-AGGTAAGT-AACCGAAAGGTTCTATACTAGAACTGTATATAAACTATTTGT
HK6IEBF01BSDD8 TCTTCTCCTAAAAACC-TAAAGTATCAAGG-TTTTT-ACAAACCTCTACATT-AGGTAAGT-AACCGAAAGGTTCTATACTAGAACTGTATATAAACTATTTGT
contig00022 HK6IEBF01BPQRL TCTTCTCCTAAAAACC-TAAAGTATCAAGG-TTTTT-ACAAACCTCTACATT-AGGTAAGT-AACCGAAAGGTTCTATACTAGAACTGTATATAAACTATTTGT
contig00023 HK6IEBF01BBGE9 TCTTCTCCTAAAAACC-TAAAGTATCAAGG-TTTTT-ACAAACCTCTACATT-AGGTAAGT-AACCGAAAGGTTCTATACTAGAACTGTATATAAACTATTTGT
contig00024 HK6IEBF01B1K98 TCTTCTCCTAAAAACC-TAAAGTATCAAGG-TTTTT-ACAAACCTCTACATT-AGGTAAGT-AACCGAAAGGTTCTATACTAGAACTGTATATAAACTATTTGT
HK6IEBF01AXRBZ TCTTCTCCTAAAAACC-TAAAGTATCAAGG-TTTTT-ACAAACCTCTACATT-AGGTAAGT-AACCGAAAGGTTCTATACTAGAACTGTATATAAACTATTTGT
contig00025 HK6IEBF01AG8I1 TCTTCTCCTAAAAACC-TAAAGTATCAAGG-TTTTT-ACAAACCTCTACATT-AGGTAAGT-AACCGAAAGGTTCTATACTAGAACTGTATATAAACTATTTGT
HK6IEBF01BWH8V TCTTCTCCTAAAAACC-TAAAGTATCAAGG-TTTTT-ACAAACCTCTACATT-AGGTAAGT-AACCGAAAGGTTCTATACTAGAACTGTATATAAACTATTTGT
HK6IEBF01AV2R6 TCTTCTCCTAAAAACC-TAAAGTATCAAGG-TTTTT-ACAAACCTCTACATT-AGGTAAGT-AACCGAAAGGTTCTATACTAGAACTGTATATAAACTATTTGT

base:
read:
val:

Info Stafal: Opened Assembler project: /home/LMDM/Plocha/analyza/Stafal

Analysis messages

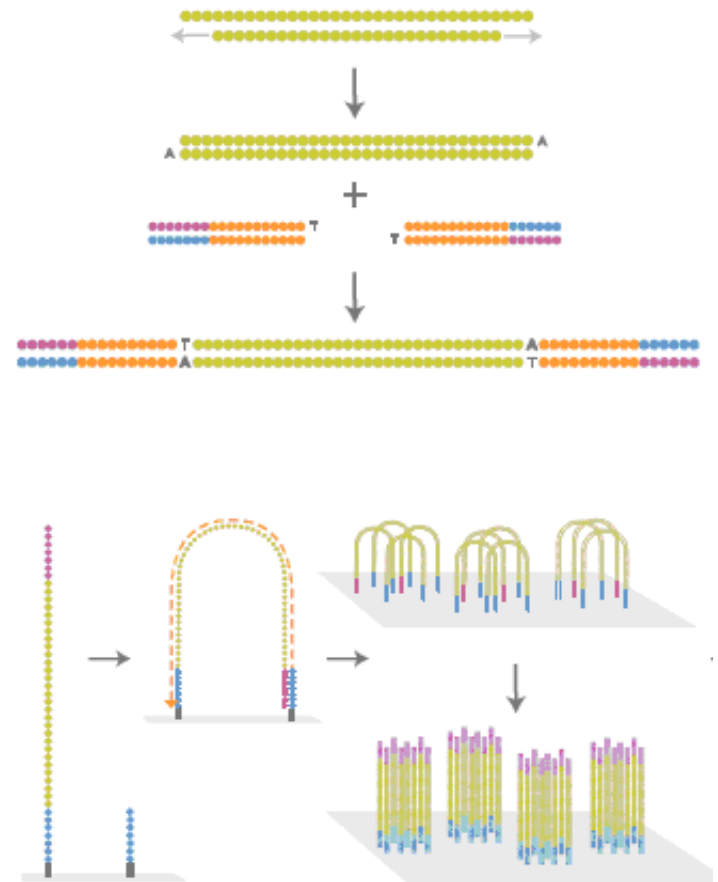
[GS De novo Assembl... LMDM [Untitled 1 - OpenOffi... GS De novo Assembler

Technologie firmy Illumina/Solexa

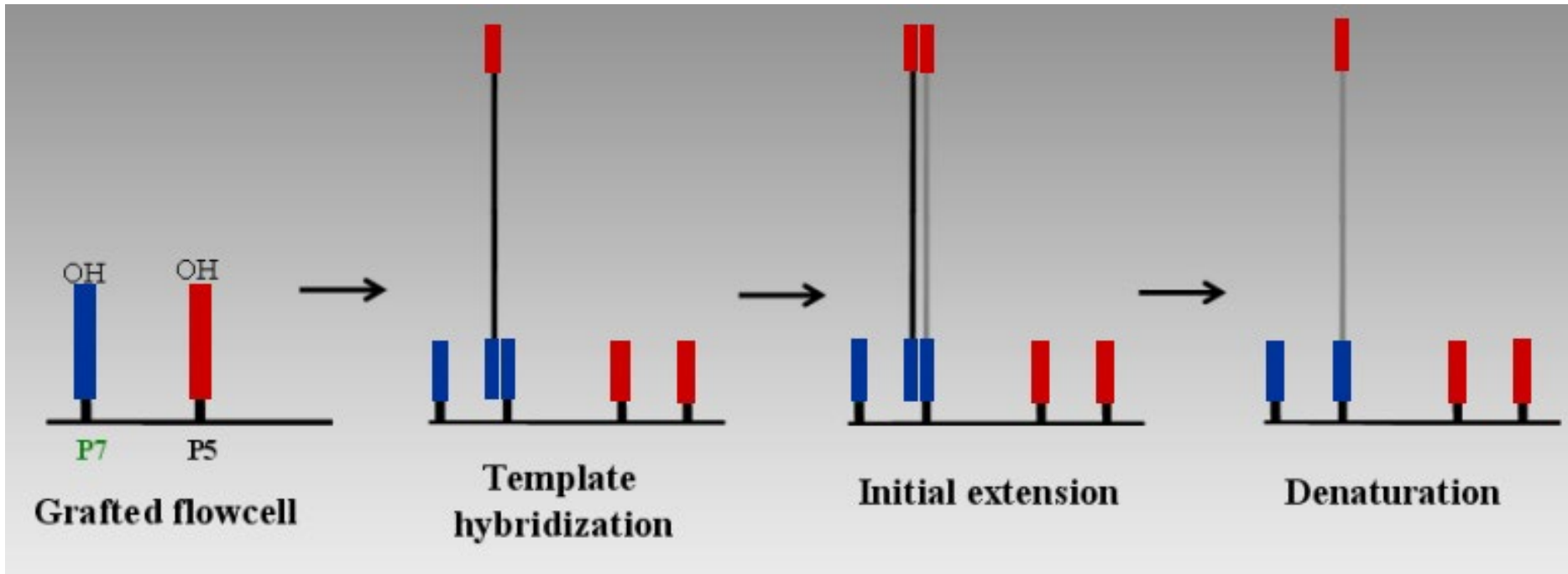
- Uvedena na trh 2006
- Prošla řadou inovací, zejména délky čtení
- Masivní paralelní sekvenování („polony“ sequencing)
- Sekvenacování syntézou na čipu (flow cell), které využívá strategii reverzibilních terminátorů
- Nevyžaduje klonování ani přípravu knihovny na mikrosférách
- Dosahuje 99,9 % přesnosti

Příprava knihovny – polony PCR

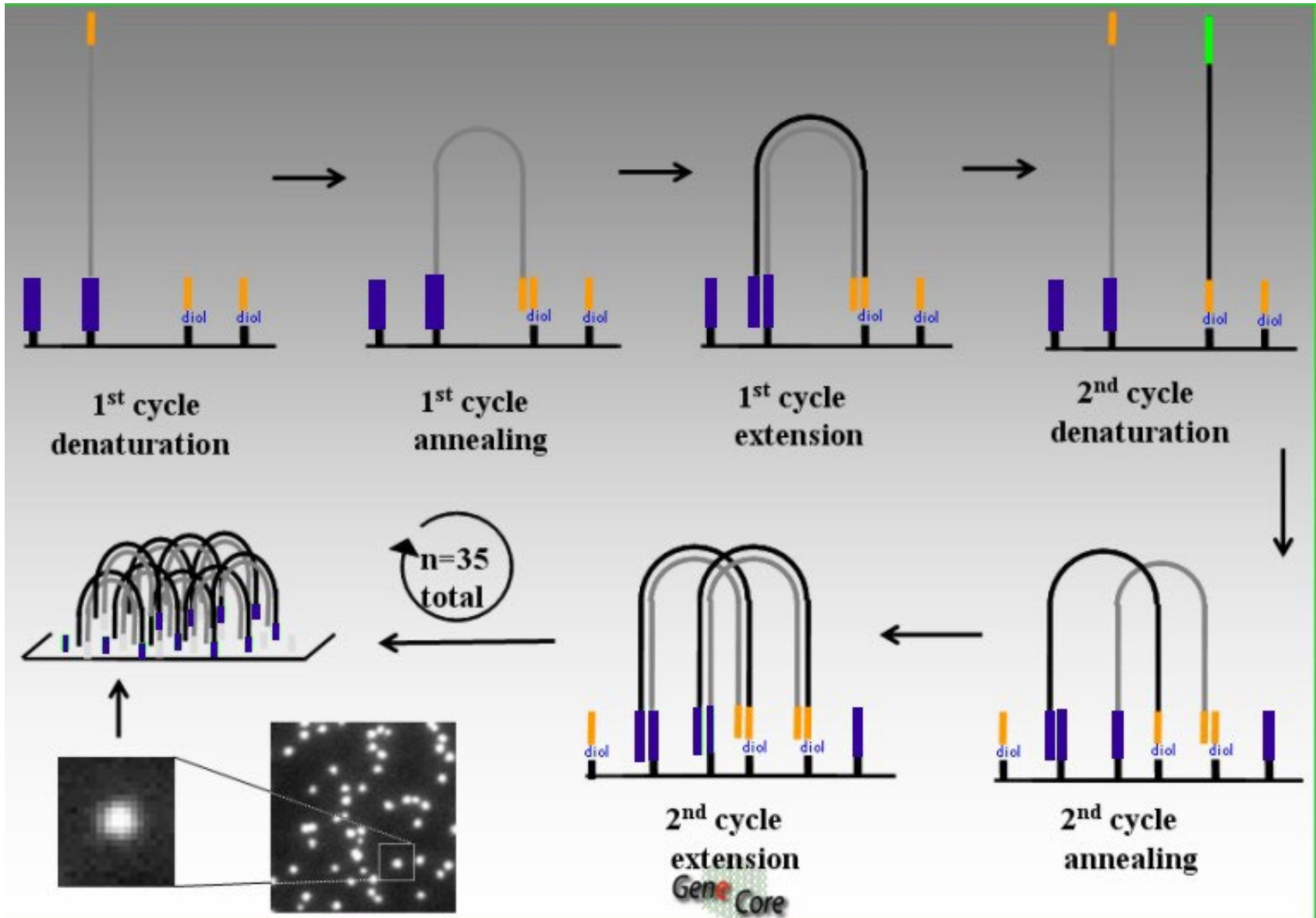
- Náhodná fragmentace DNA na krátké úseky 200 – 500 bp
- Zatupení konců a vytvoření 1 nt A-přesahu na 3'-konci (T4 DNA polymeráza, Klenow a polynukleotid-kináza T4)
- Navázání adaptorů umožňujících kovalentní vazbu na opticky transparentní povrch pro sekvenování
- Každý fragment je na povrchu uchycen pouze jedním koncem, po přidání enzymů pro amplifikaci dochází k ohnutí fragmentu do „mostu“.
- Výsledkem amplifikace jsou dva řetězce, každý s jedním volným a jedním pevným koncem
- Po denaturaci jsou fragmenty narovnány a uspořádány do shluků, ve kterých je dosažena značná hustota, až 1000 kopií fragmentu na μm^2 povrchu
- Na celém povrchu je dosaženo hustoty deseti milionů shluků na cm^2



Bridge amplification: initiation

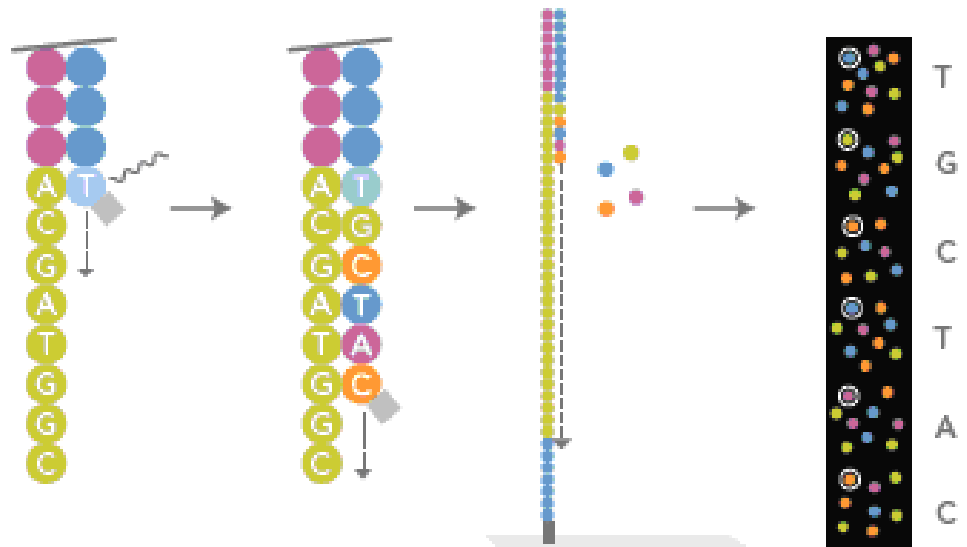


On the surface: complementary oligos



Illumina

- **Průběh sekvenační reakce**
- Přidání primerů ve směsi s DNA polymerázou a fluorescenčně značenými dNTP
- Nukleotidy jsou na 3'-konci modifikovány tak, že umožňují **reverzibilní ukončení** prodlužujícího se řetězce DNA
- Je tak zajištěno, že se řetězec v každém cyklu prodlouží právě o jednu bázi.
- Po zachycení obrazu připojené báze následuje odblokování 3'-konce



Illumina

- Délka čtených úseků:
 - HiSeq : 75 nt or 150 nt
 - MiSeq : 300 nt
 - NovaSeq: 2x 250 nt
- Mnohonásobné pokrytí sekvence (30 x – 100 x)
- Možnost mnohonásobného sekvenování
 - Povrch sklíčka rozdělen do částí
 - Vzorke označeny pomocí **dvanácti** různých oligonukleotidů
 - Současně lze analyzovat až 96 různých vzorků.
- Produkuje desítky až stovky Gb za 1 běh (2 - 8 dnů)
- Aplikace
 - Resekvenování
 - Sekvenování RNA
 - Stanovení metylací

MiSeq



Sekvenování třetí generace

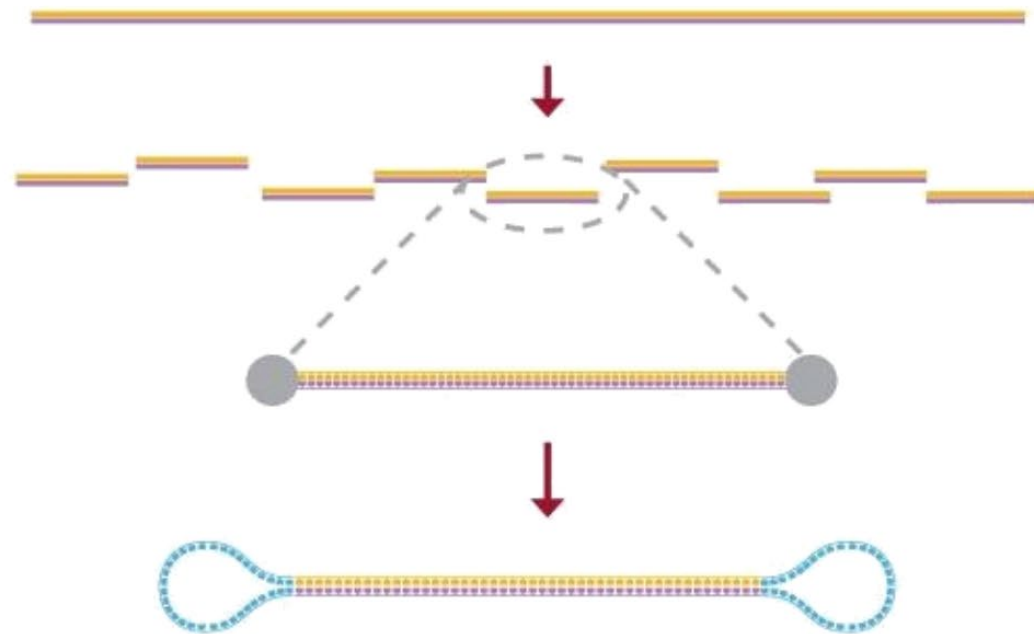
- Analýza jedné molekuly
- Potřeba malého množství vzorku
- Bez rizika kontaminace
- Přesné čtení homopolymerních úseků
- Analýza jakékoli NK (DNA/RNA)
- Analýza poškozených NK (archaické, muzejní, forenzní)
- Analýza DNA z nekultivovatelných organismů
- Absolutní kvantifikace

PacBio

- **Kružnicové kontinuální sekvenování** (Single Molecule Real Time Sequencing – SMRT)
- Templát obsahuje **dvouřetězcovou oblast** (inzert) na obou koncích **uzavřenou jednořetězcovými vlásenkovými smyčkami**
- Vlášenkové smyčky představují jednořetězcovou oblast, na kterou se může vázat sekvenační primer.
- Polymeráza prodlužuje primer z jedné vlásenkové struktury využívá jedno vlákno DNA jako templát a druhé vytěsňuje
- Když se polymeráza dostane zpět k 5'konci primeru, začne vytlačovat již nasyntetizovaný řetězec a pokračuje v syntéze DNA
- Výsledná sekvence je odvozená z obou vláken

Příprava knihovny pro PacBio

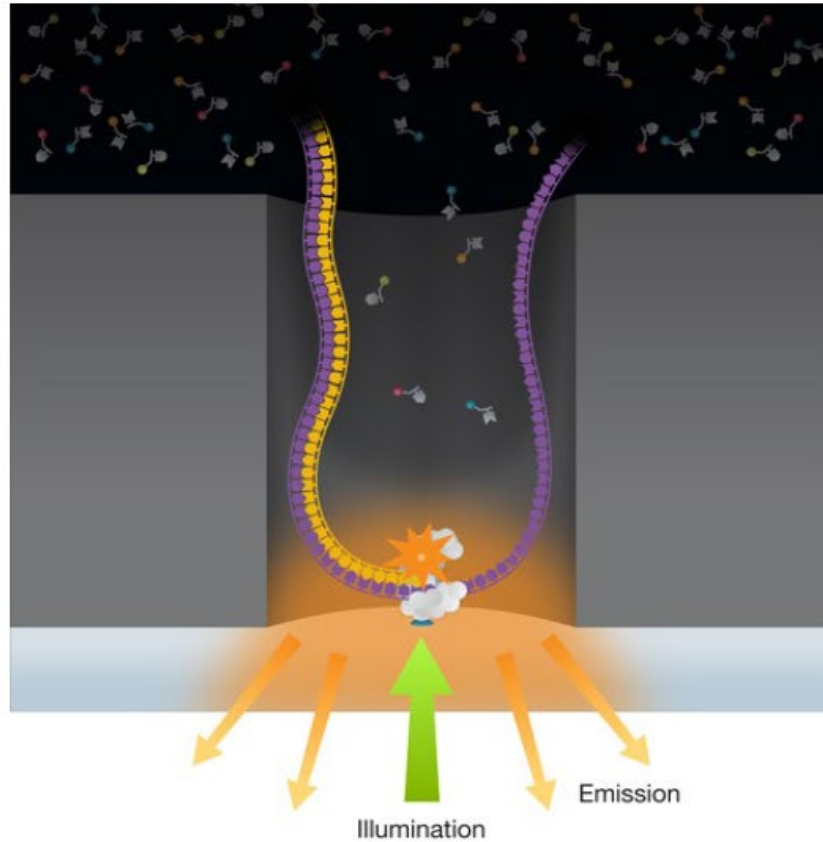
Template Preparation



SMRTbell™ Template preparation can be used to create libraries of various insert sizes from 250 bp to 20,000 bp depending on the needs of the application.

Sekvenování třetí generace – PacBio RS

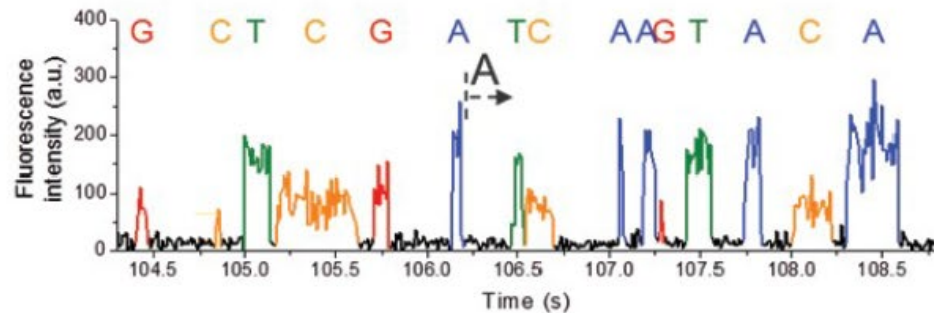
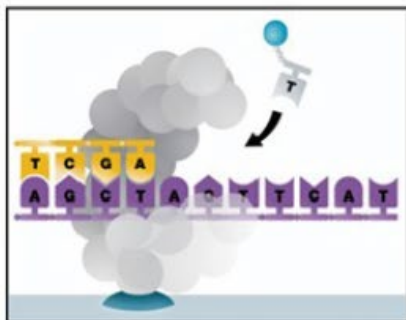
Pacific Biosciences



4 nucleotides with different fluorescent dye simultaneous present

2-3 nucleotides/sec
2-3 Kb (up to 50) read length
6 TB data in 30 minutes

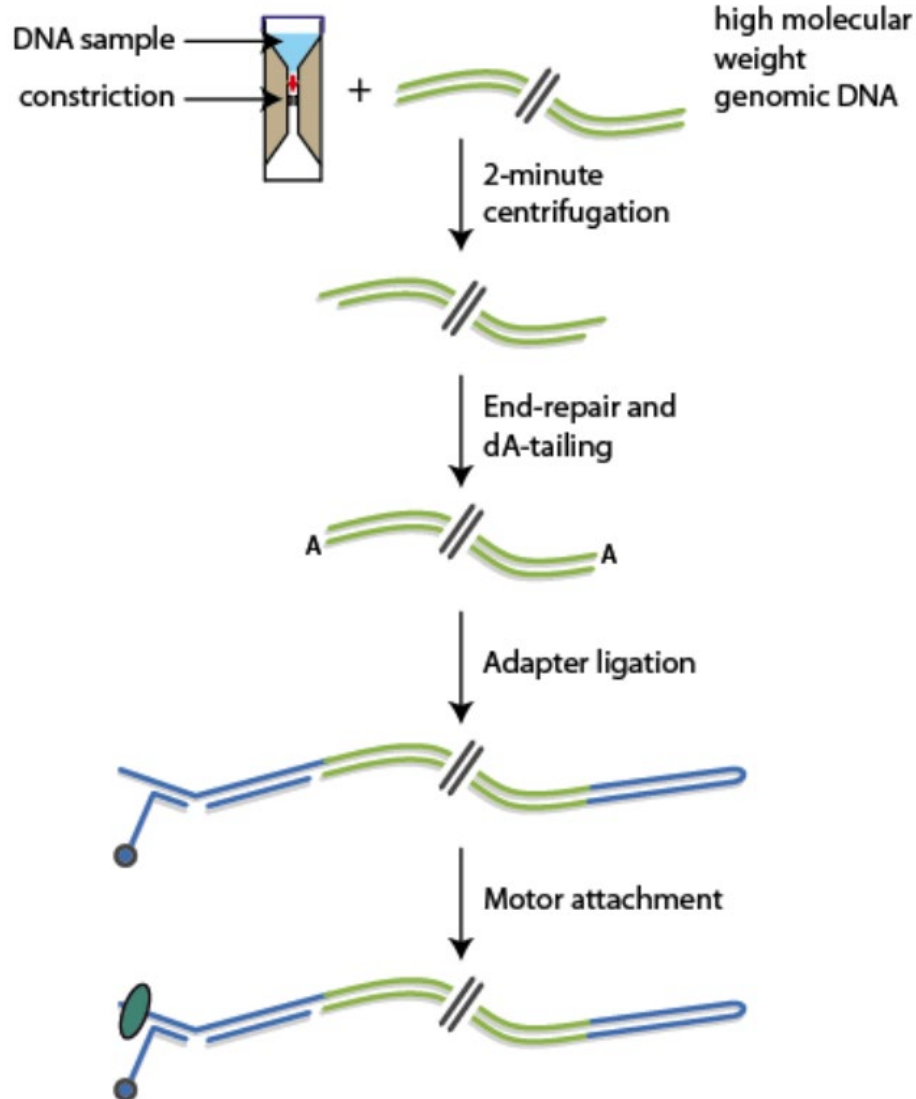
laser damages polymerase



Technologie NanoPore

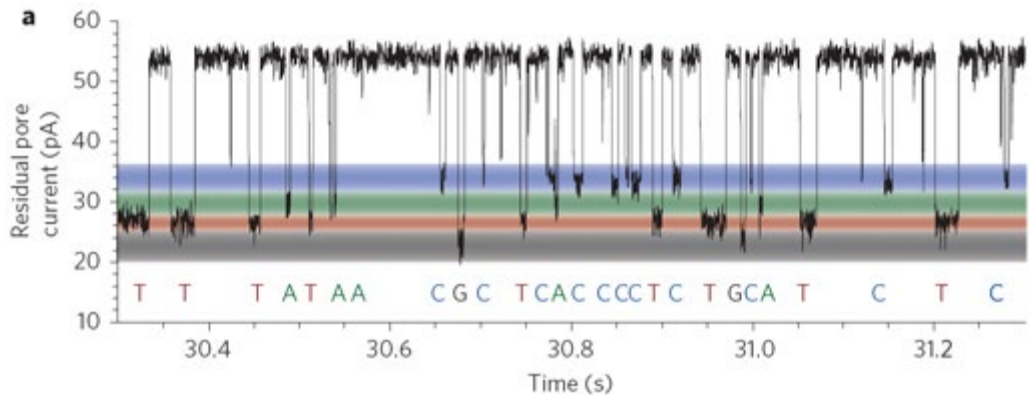
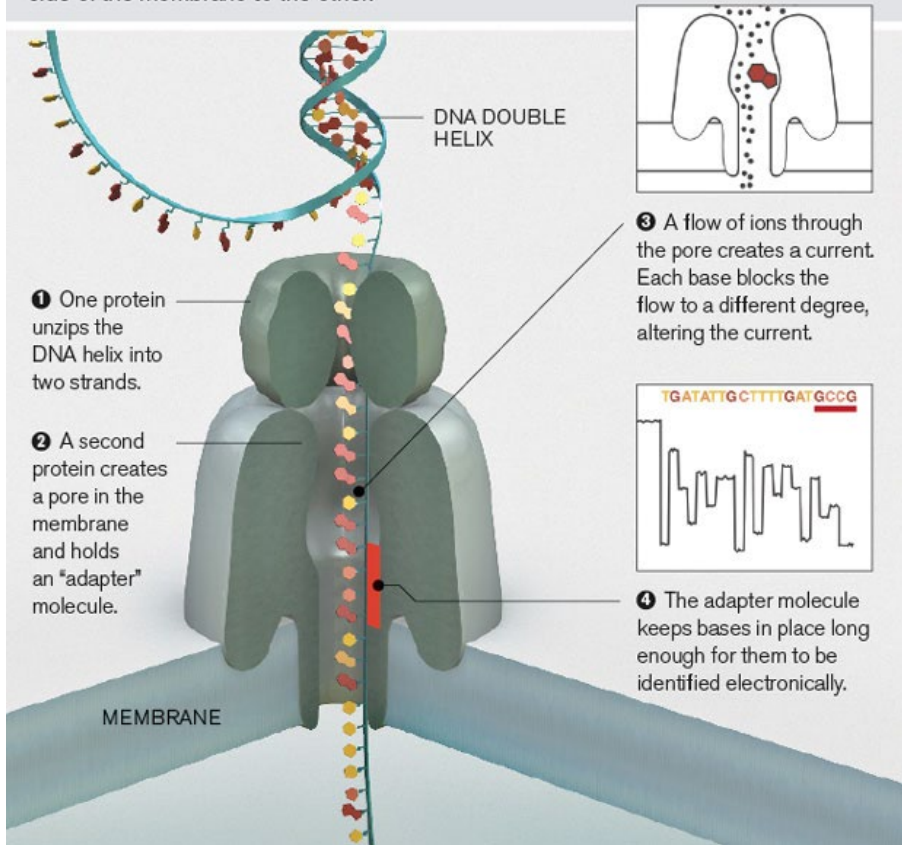
- **Využívá měření elektrického potenciálu při průchodu DNA přes membránu (1995)**
- Elektricky odolná polymerní membrána (synтетická lipidová dvouvrstva) s transmembránovým porózním proteinem
- Modifikovaný α hemolysin (α HL) nebo porin A (MspA) *Mycobacterium smegmatis*
- Nanopore je ponořený ve vodivém roztoku
- Průchod bází na sekvenovaném řetězci přerušuje proud, který je **specifický podle procházející báze**

G-tube sense/antisense



Příprava knihovny MinION

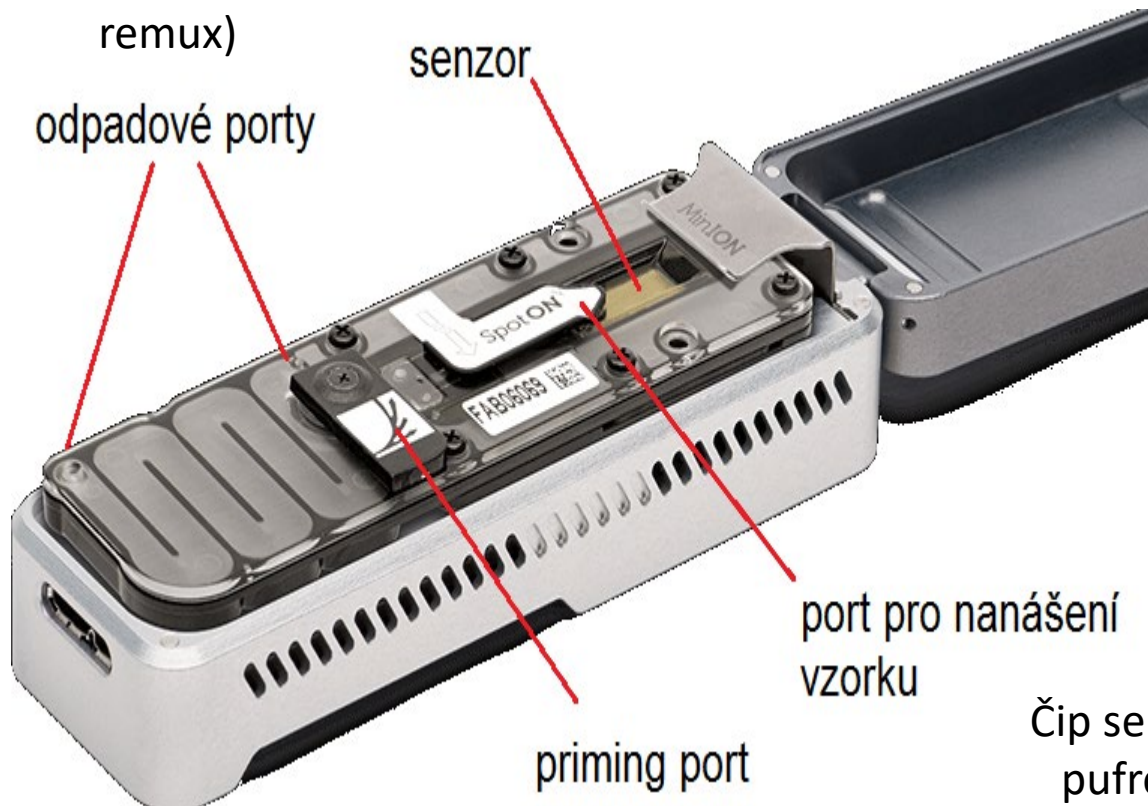
DNA can be sequenced by threading it through a microscopic pore in a membrane. Bases are identified by the way they affect ions flowing through the pore from one side of the membrane to the other.



Flowcell - MinION



- 2048 jamek s póry (záruka na min. 800 funkčních nanopórů)
- 512 kanálů (ASIC obsahuje 1 zesilovač signálu na 4 jamky)
- čtení vždy jen z jedné jamky, po nastavených intervalech se střídají (tzv. remux)



nanášení vzorku

Čip senzoru musí být neustále zaplaven
pufrem **vnesení bubliny nebo odsátí
pufru vede k nevratnému poškození**

Srovnání sekvenačních metod

Srovnání metod pro sekvenování

	Metoda	Příprava knihovny
Klasické	Maxam-Gilbert (chemická)	Radioaktivně značené ssDNA
	Sanger (enzymová)	Inzerty v plazmidových vektorech / produkty PCR
NGS	454 (pyrosekvenování)	Emulzní PCR
	Polovodičové (IonTorrent)	Emulzní PCR
	Illumina	Polony PCR
	Solid	Emulzní PCR + imobilizace
Třetí generace	PacBio	Ligace adaptorů se smyčkou
	Nanopore	Ligace adaptorů + molekulární motor
	Helicos	Ligace adaptorů

Srovnání metod pro sekvenování

	Metoda	Princip reakce
Klasické	Maxam-Gilbert (chemická)	Degradace chemickými činidly
	Sanger (enzymová)	Syntéza DNA polymerázou s terminátory, elektroforéza
NGS	454 (pyrosekvenování)	Syntéza DNA polymerázou, detekce pyrofosfátu (PP)
	Polovodičové (IonTorrent)	Syntéza DNA polymerázou, detekce H ⁺
	Illumina	Syntéza DNA polymerázou s reverzibilními terminátory
	Solid	Série ligací sond + posun rámce
Třetí generace	PacBio	Syntéza DNA polymerázou
	Nanopore	Měření změn el. potenciálu při průchodu inertní membránou
	Helicos	Syntéza DNA polymerázou s reverzibilními terminátory

Srovnání metod pro sekvenování

	Metoda	Délka čtení
Klasické	Maxam-Gilbert (chemická)	150 – 300 nt
	Sanger (enzymová)	600 – 1200 nt
NGS	454 (pyrosekvenování)	500 nt
	Polovodičové (IonTorrent)	400 nt
	Illumina	1× 300 nt, 2× 150 nt, 2× 75 nt
	Solid	30 – 40 nt
Třetí generace	PacBio	10 – 15 kb
	Nanopore	> 10 kb
	Helicos	200 nt

Srovnání metod pro sekvenování

	Metoda	Uspořádání
Klasické	Maxam-Gilbert (chemická)	Single read
	Sanger (enzymová)	Single read, Pair-end read
NGS	454 (pyrosekvenování)	Single read, Pair-end read
	Polovodičové (IonTorrent)	Single read, Pair-end read
	Illumina	Single read, Mate-pair read
	Solid	Mate-pair read
Třetí generace	PacBio	Single read
	Nanopore	Single read
	Helicos	Single read