



**LÉKAŘSKÁ FAKULTA MASARYKOVY UNIVERSITY**  
**Interní hematoonkologická klinika LF MU a FN Brno**  
**Centrum molekulární biologie a genové terapie**



# „Next-Gen“ Sequencing

Boris Tichý  
16.12.2011



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

## Nové technologie (od r. 2005)

### Massive parallel sequencing

Statisíce až miliardy paralelních sekvenací

### Klonální amplifikace/sekvenování

Jednotlivé sekvence odpovídají jednotlivým molekulám DNA/RNA

### Single molecule sequencing

Techniky pro přímé sekvenování jednotlivých molekul DNA/RNA

### 2010 → řada dostupných technologií

454, Illumina, SOLiD, PacBio, Helicos, IonTorrent, Complete Genomics



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

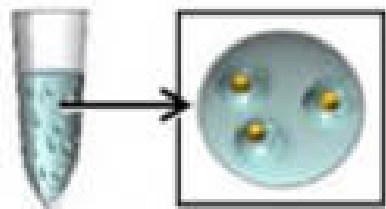
# Klonální amplifikace

## Emulzní PCR (emPCR)

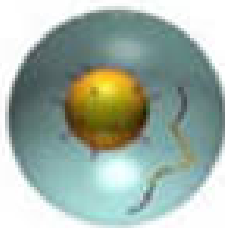
454, SOLiD, Polonator

PCR reakce uzavřeny v mikroreaktorech  
Kulička, enzym, nukleotidy  
Voda v oleji

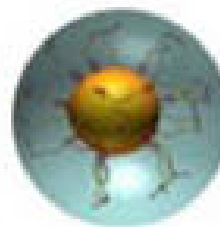
### Emulsion-based conal amplification



Anneal ssDNA  
to an excess of  
DNA Capture  
Beads



Emulsify beads  
and PCR reagents  
in water-in-oil  
micro reactors



Clonal amplification  
occurs inside micro  
reactors



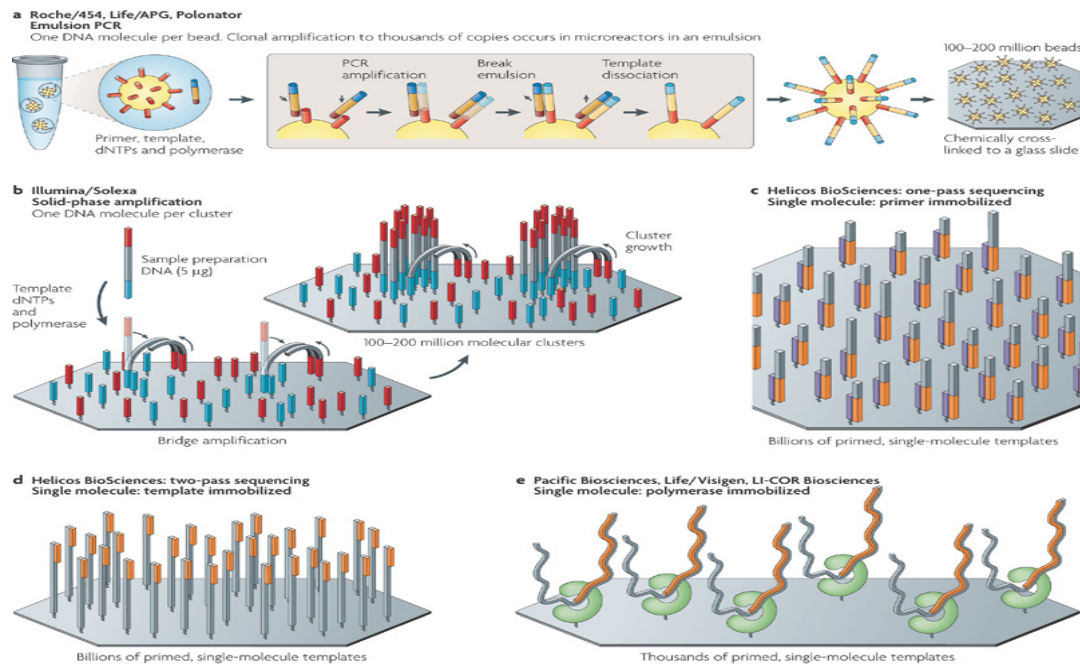
Break micro  
reactors,  
enrich for  
DNA-positive

# Klonální amplifikace

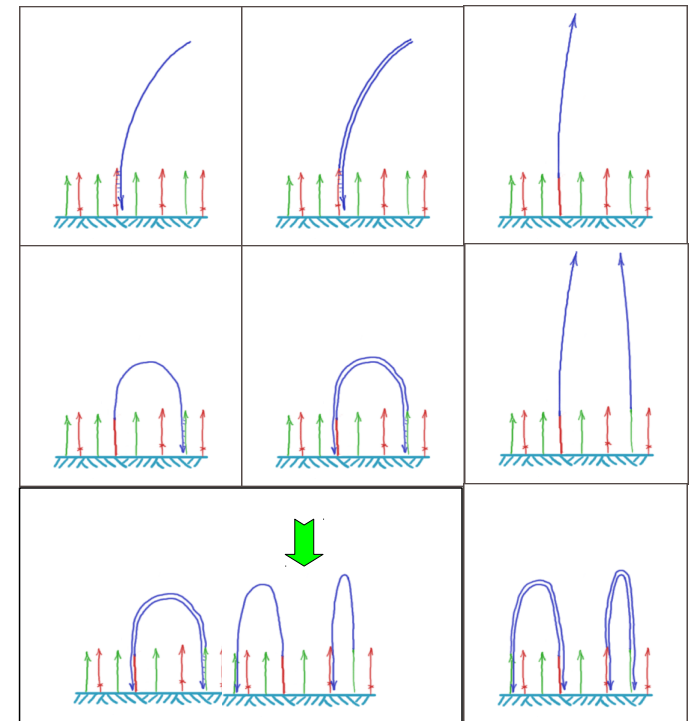
## Bridge amplifikace

Illumina

Templát i PCR produkty fixovány k povrchu flow-cell  
Vznik "clusters"



Nature Reviews | Genetics



# Sekvenování

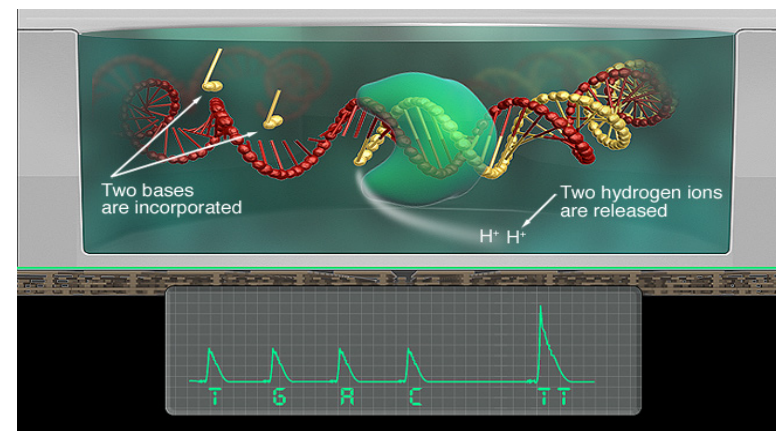
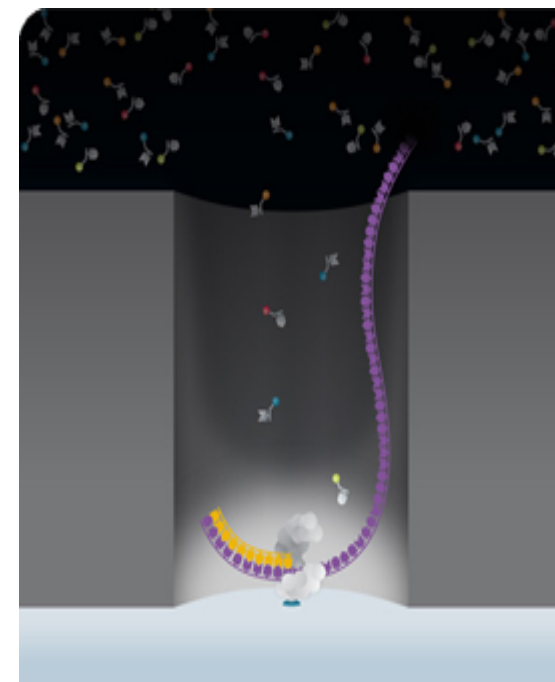
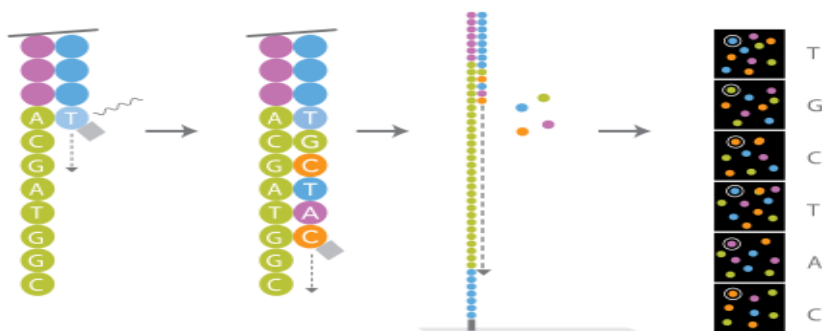
## Sekvenování syntézou

Illumina, Helicos, Pacific Biosciences, IonTorrent, 454

Reverzibilně terminační, fluorescenčně značené nukleotidy  
Illumina, Helicos

Fluorescenčně značené nukleotidy  
PacBio (SMRT™)

Neznačené nukleotidy  
IonTorrent (změny pH), 454 (pyrosekvenace)



# Sekvenování

## Sekvenování ligací/hybridizací

SOLiD, Polonator, Complete Genomics

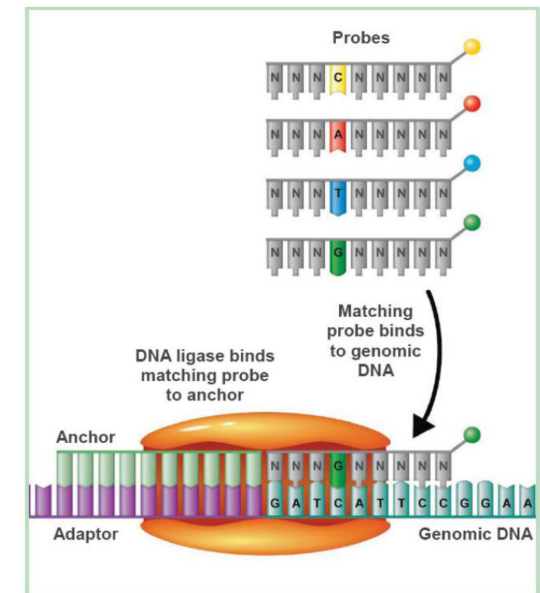
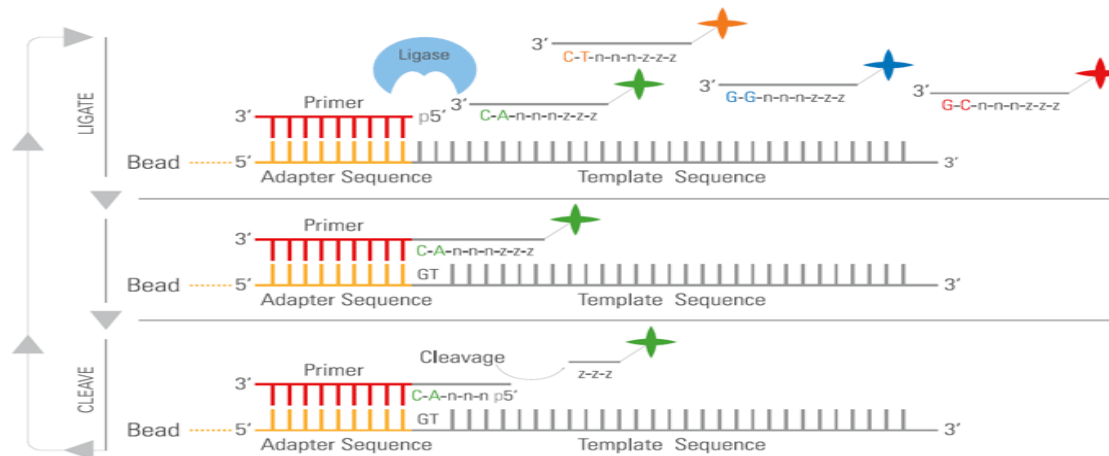
Hybridizace a ligace fluorescenčně značených sond

Ligáza připojí sondu k primeru

Sonda – degenerovaná, známý je pouze nukleotid na sekvenované pozici

Single nebo two base kódování

Většinou jen krátké úseky



# Sekvenování

Dlouhé vs. krátké

SOLiD – max. 75b

Illumina - max. 150b (250b paired-end)

Roche (454) – max. 600b

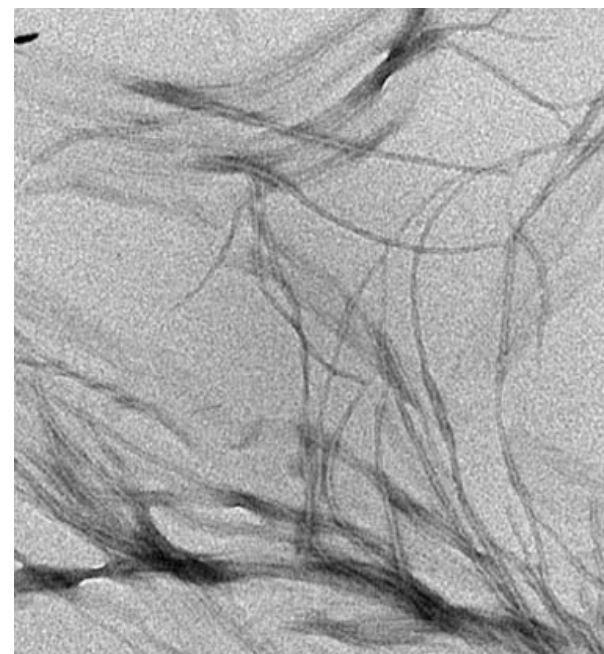
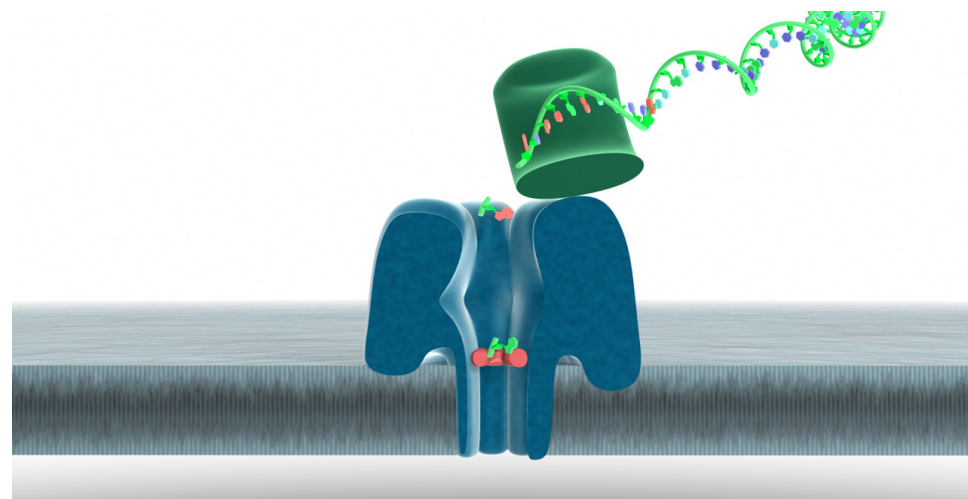
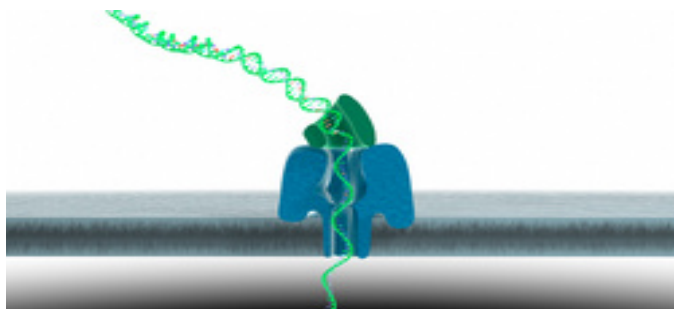
PacBio – až 10.000b

Další generace?

Single molecule

Nanopores

Electron microscopy



031706\_24bp on SiN\_01.tif  
24 bp dsDNA on Silicon Nitride  
First Sample  
Print Mag: 105000x @ 7.0 in  
15:59 03/17/06

100 nm  
HV=60kV  
Direct Mag: 10000x  
AMT Camera System

# Využití

Stejně nebo širší jako microarrays

Celogenomové sekvenování (resekvenování i *de-novo*)  
Lze objednat, od ~ \$10.000 (výzkum od \$4.000)

Deep sequencing (sekvenování s vysokým pokrytím)

Sekvenování mikrobiomu, metagenomika

Epigenomika

Genová exprese

BGI – největší sekvenační centrum (Čína)

> 130 přístrojů poslední generace

Kapacita > 1 900 000 000 000 000 bazí ročně (~ 300.000 lidských genomů)



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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