



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



„Next-Gen“ Sequencing

Boris Tichý
27.11.2012



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

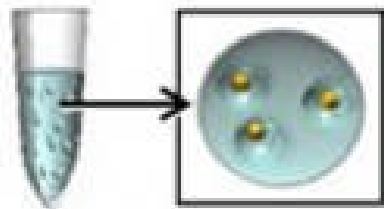
Klonální amplifikace

Emulzní PCR (emPCR)

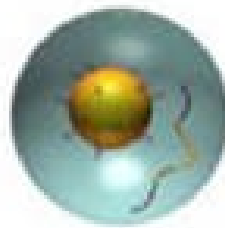
454, SOLiD, Polonator

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

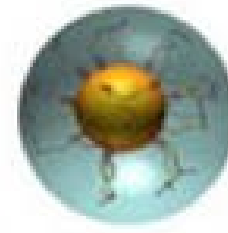
Emulsion-based conal amplification



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



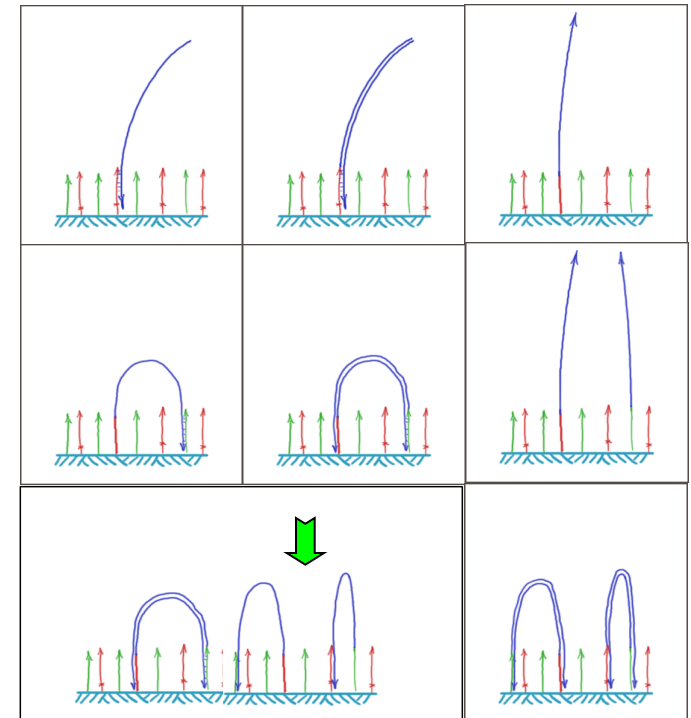
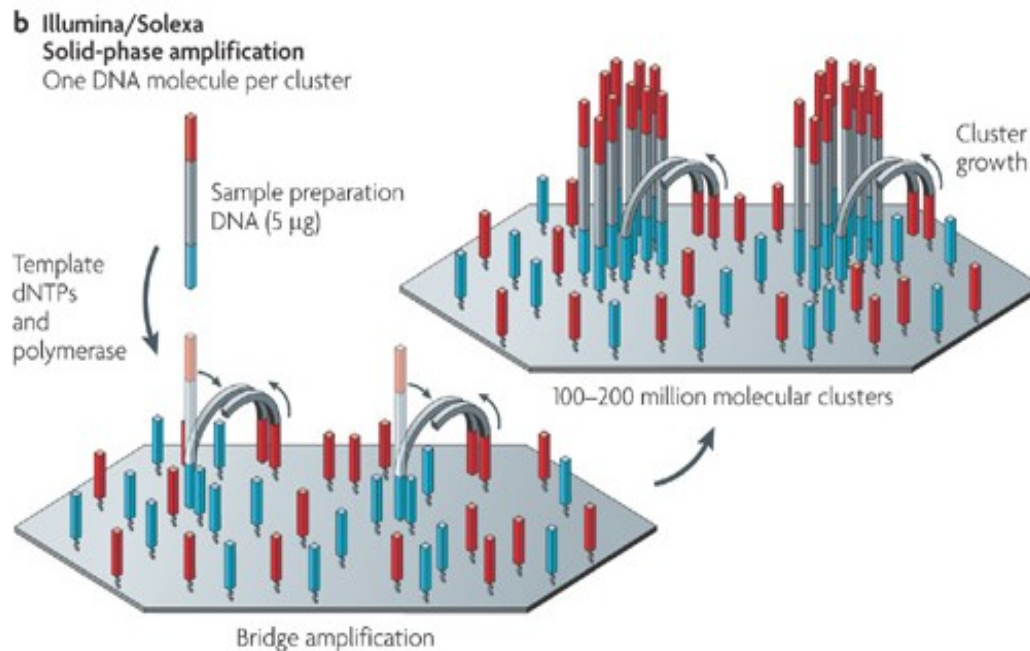
Break micro
reactors,
enrich for
DNA-positive

Klonální amplifikace

Bridge amplifikace

Illumina

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



Sekvenování

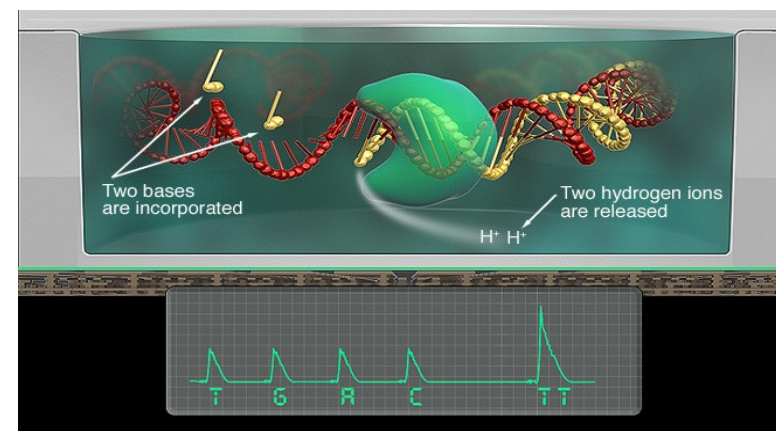
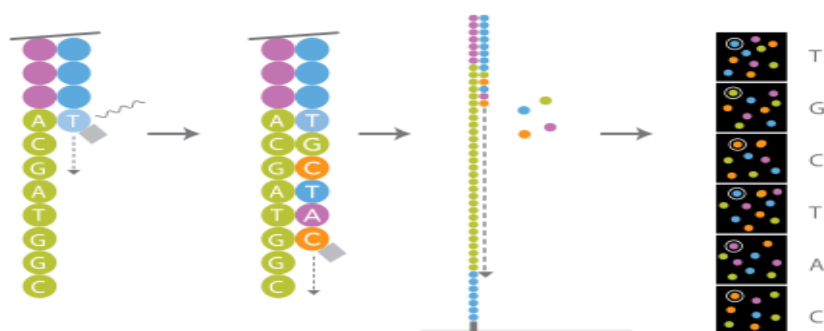
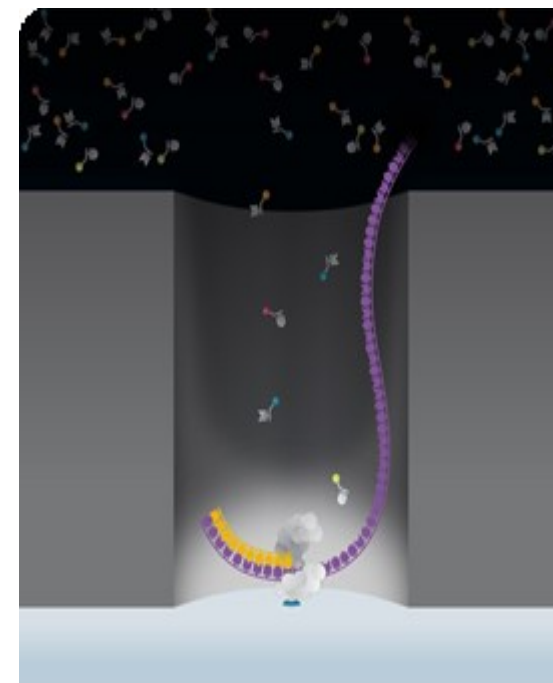
Sekvenování syntézou

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

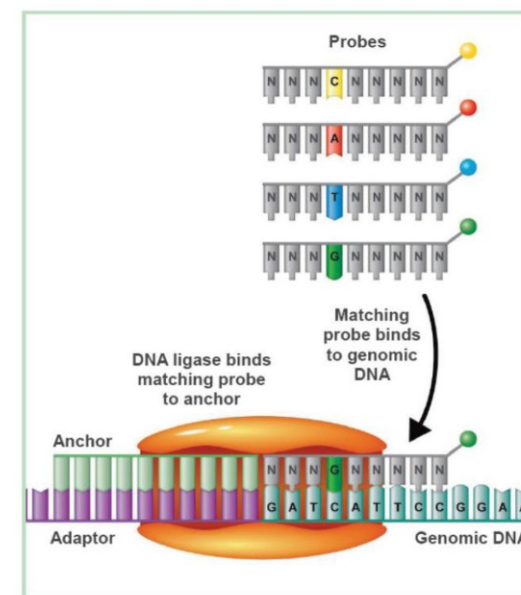
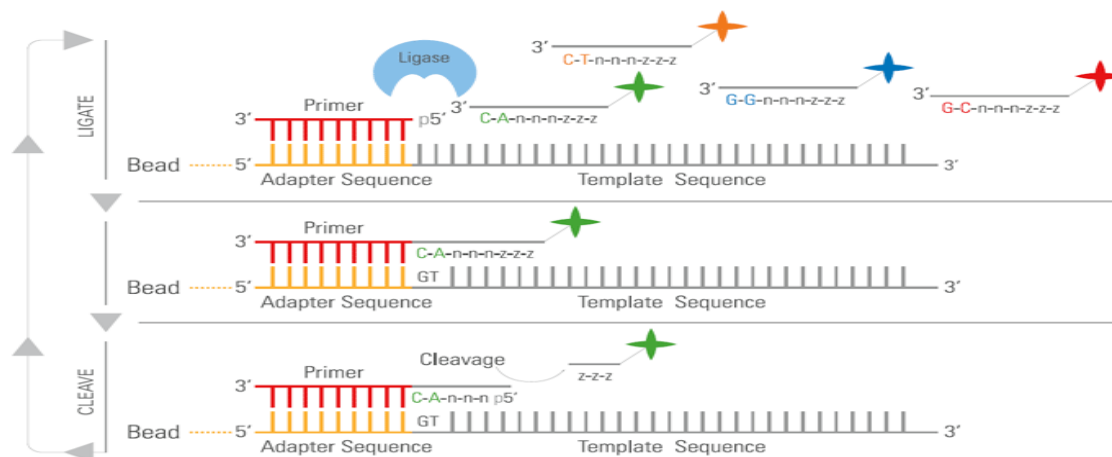
Hybridizace a ligace fluorescenčně značených sond

Ligáza připojí sondu k primeru

Sonda – degenerovaná, známý je pouze nukleotid na sekvenované pozici

Single nebo two base kódování

Většinou jen krátké úseky

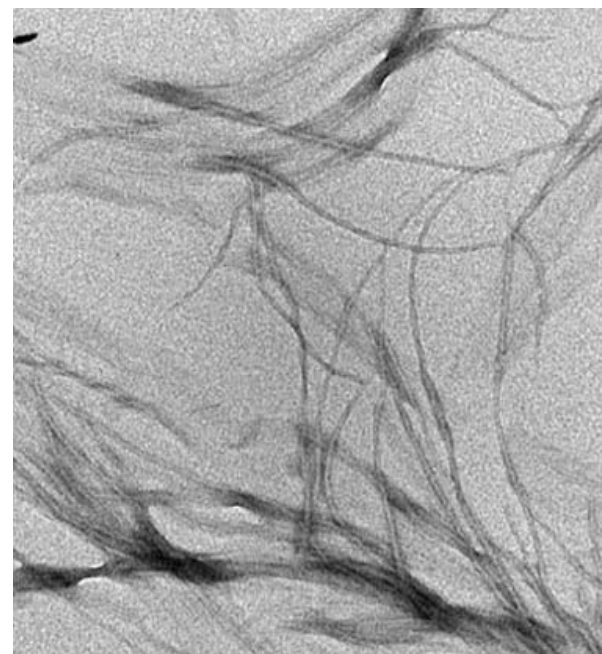
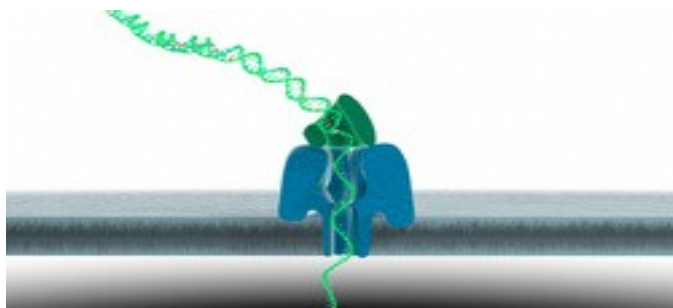


Sekvenování

Dlouhé vs. krátké
SOLiD – max. 75b
Illumina - max. 250b (500b paired-end)
Roche (454) – max. 800b
PacBio – až 10.000b

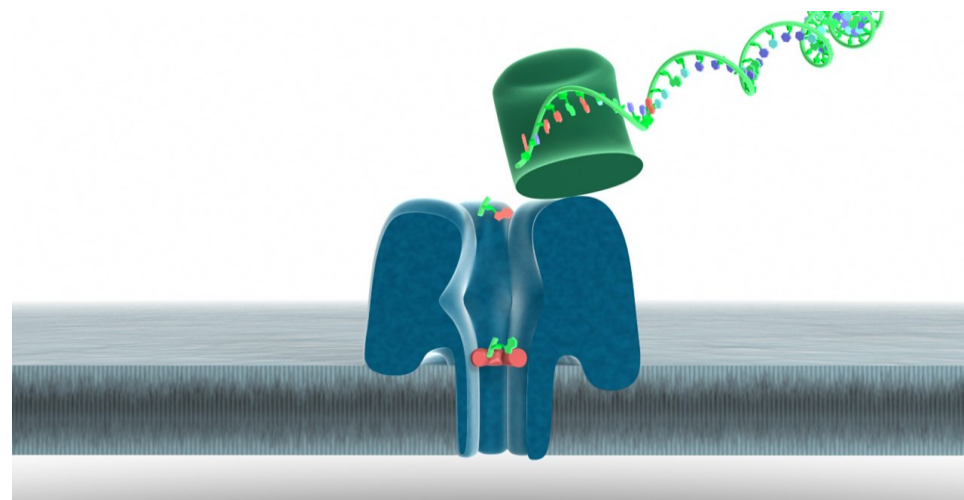
Další generace?
Single molecule

Nanopores
Electron microscopy



031704, 24bp on SiN, 01.tiff
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)
(*pokrytí = počet přečtení konkrétní pozice*)

Sekvenování mikrobiomu, metagenomika

Epigenomika

Genová exprese

BGI – největší sekvenační centrum (Čína)

> 130 přístrojů poslední generace

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



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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