

Sekvenování DNA

- stanovení pořadí nukleotidů v molekule DNA (primární struktury)

Sekven**c**ování / Sekvenování
??

Sequenc**ing** / -

die Sequenz**z**ierung / -

Klasické techniky sekvenování

- 2 metody:
 - **Chemická (Maxamova-Gilbertova)**
 - Již se nepoužívá
 - **Enzymová (Sangerova)**
 - V současnosti se používá automatická varianta
 - společný rys obou metod: příprava a separace fragmentů DNA, jejichž velikost se liší o 1 nukleotid
- Metody sekvenování nové generace (NGS)
- Metody sekvenování třetí generace (z jedné molekuly)

Základní požadavky pro úspěšné stanovení sekvence klasickou technikou:

- ❖ Příprava knihovny pro sekvenování - DNA s přesně definovanými konci
 - s místem pro vazbu primeru
 - s koncovou značkou
- ❖ Příprava souboru všech fragmentů ssDNA lišících se svou délkou o jeden nukleotid
- ❖ Přesné rozdělení těchto fragmentů na základě jejich délky a detekce koncové báze

Chemická metoda (Maxam-Gilbert)

Sekvence je odvozena z molekuly DNA, která se chemicky degraduje v místech, kde se vyskytuje báze určitého typu na fragmenty.

Ty se následně oddělují elektroforézou.

Enzymatická metoda (Sanger)

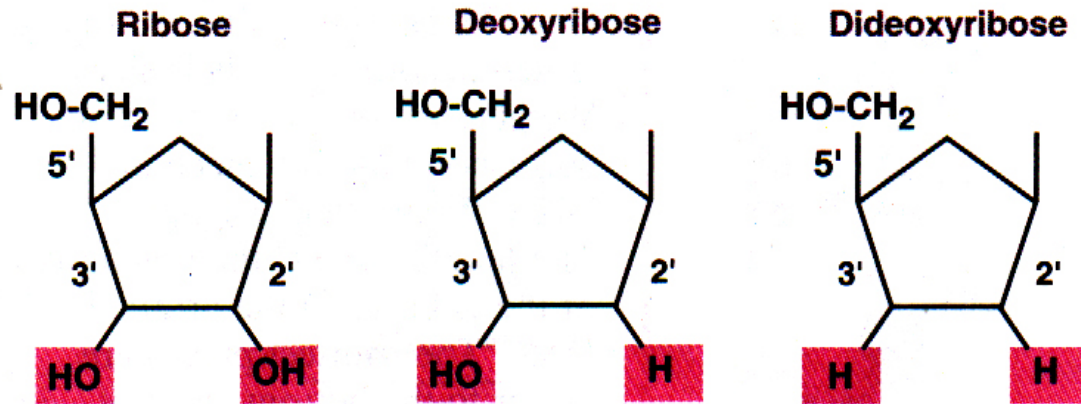
1. Příprava ssDNA jejíž sekvence má být stanovena
2. Rozdělení do 4 vzorků
3. Reakce s DNA polymerázou při níž se začlení do syntetizované DNA místo normálního deoxyribonukleosidtrifosfátu jeho analog, který působí jako koncový inhibitor syntézy DNA - dideoxynukleosidtrifosfát (ddNTP). V každém ze 4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

Reakce obsahuje:

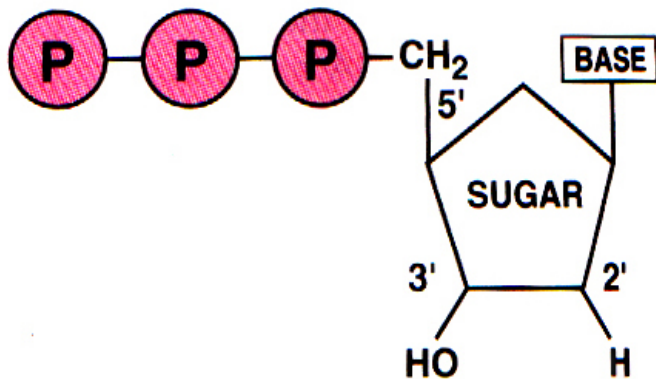
- molekulu DNA
- značený primer při pojující se k části molekuly DNA (místo odkud začínáme stanovovat sekvenci)
- směs obsahující 4 normální nukleotidy
- jeden ddNTP (v každém ze 4 vzorků je jiný)
- DNA polymerázu

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

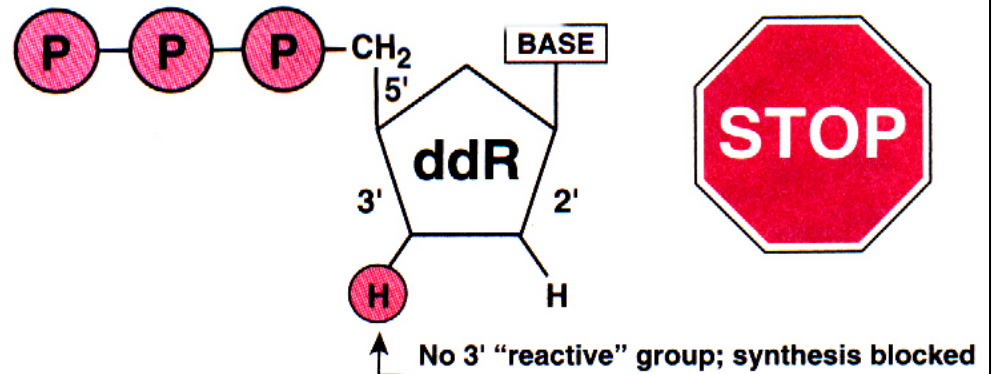
Dideoxynukleotidy nemají hydroxyl na 3'-konci



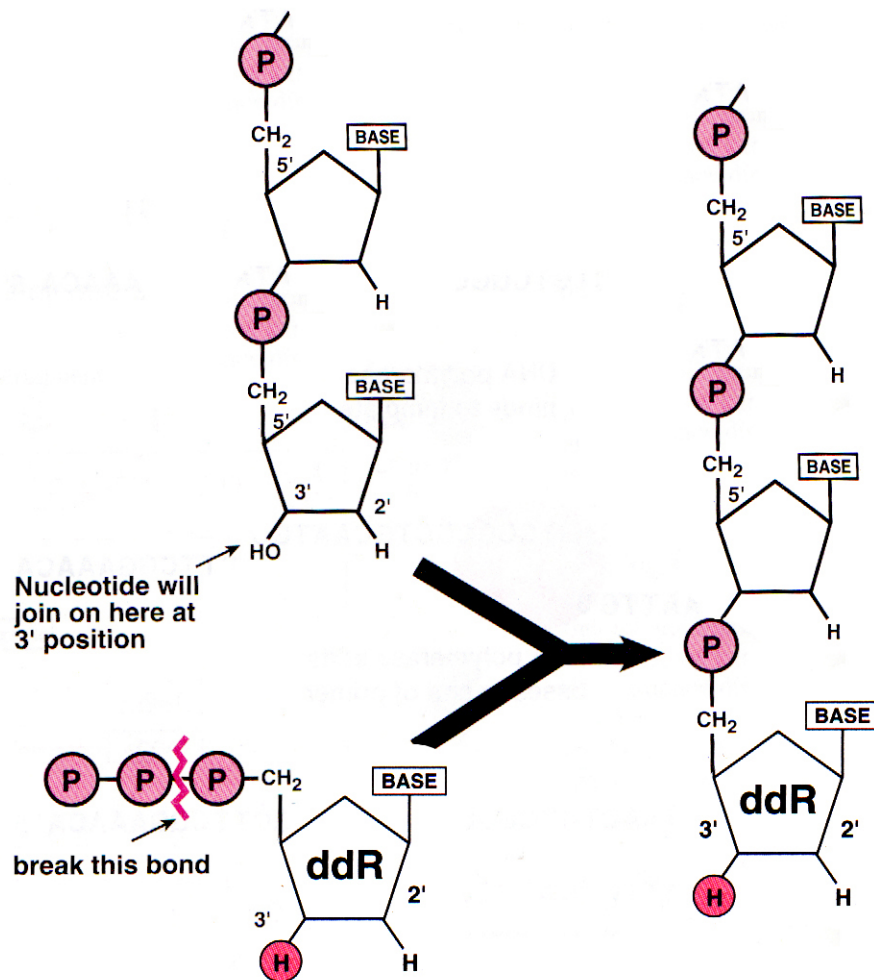
23.4 DEOXYNUCLEOSIDE TRIPHOSPHATE



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

(C)

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

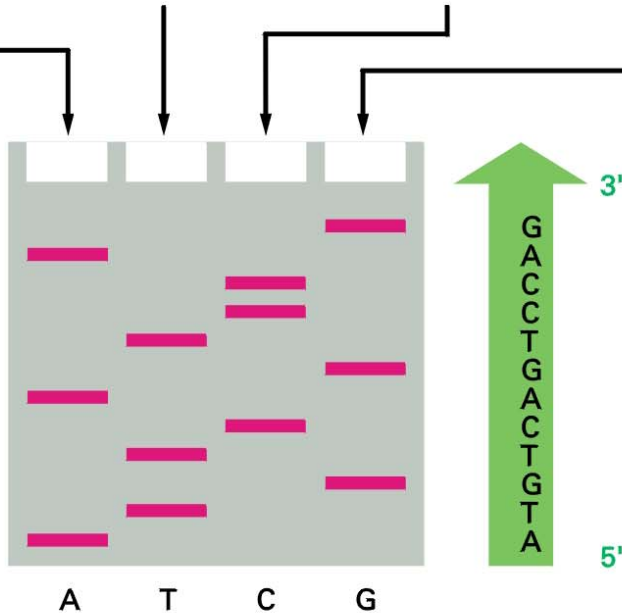
označený primer

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

+ nadbytek dATP
dTTP
dCTP
dGTP

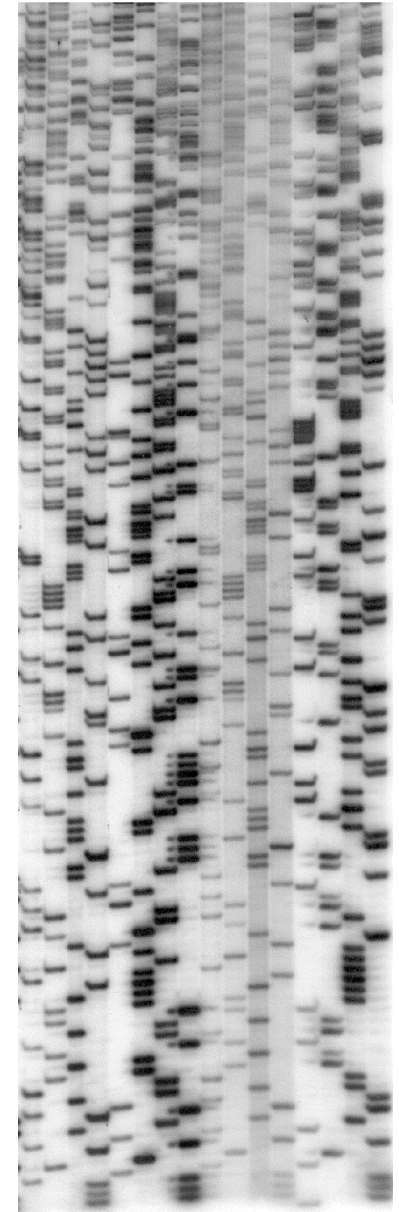
+ ddATP + DNA-polymeráza + ddTTP + DNA-polymeráza + ddCTP + DNA-polymeráza + ddGTP + DNA-polymeráza

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

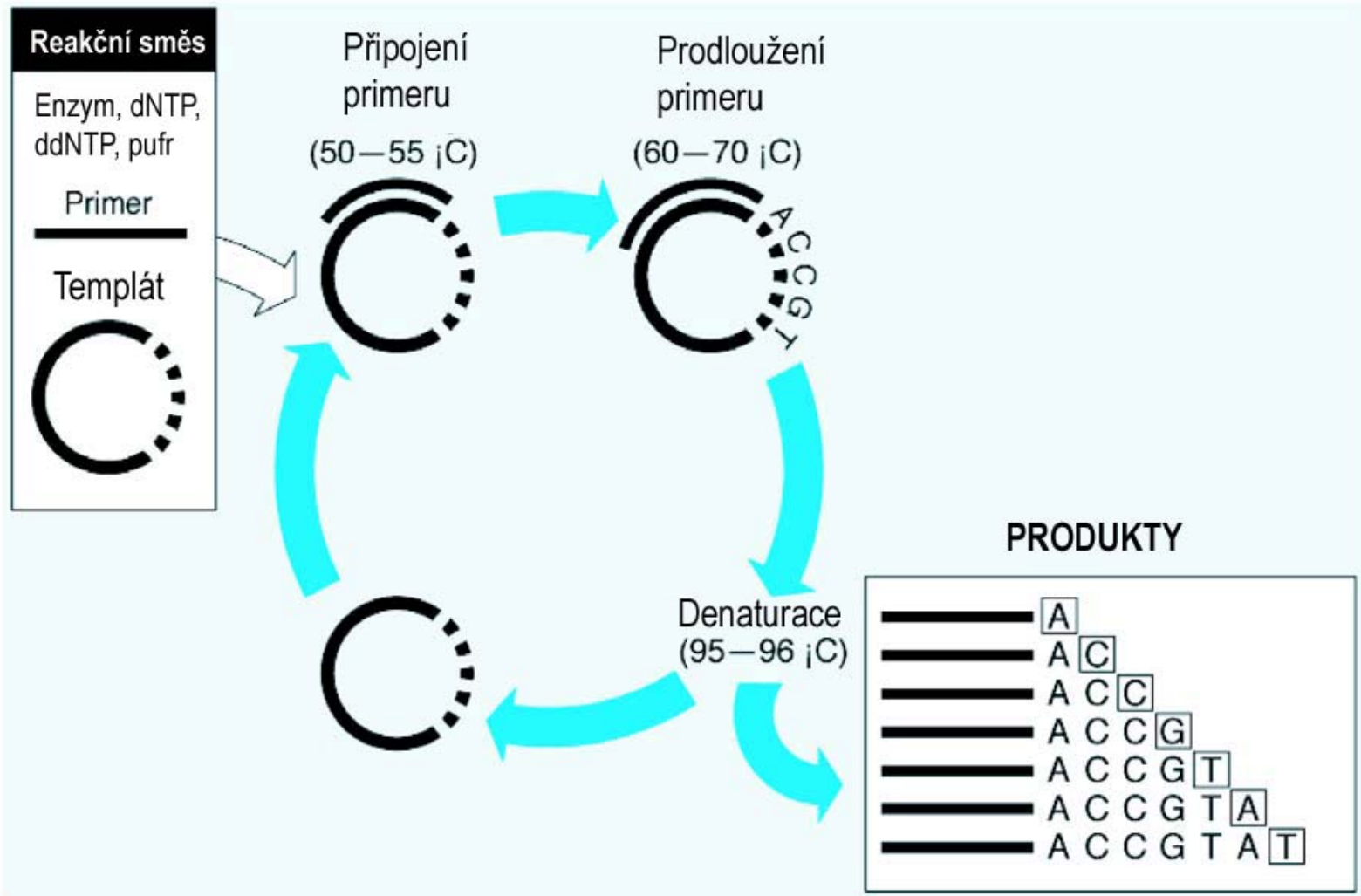


ATGC ATGC ATGC ATGC

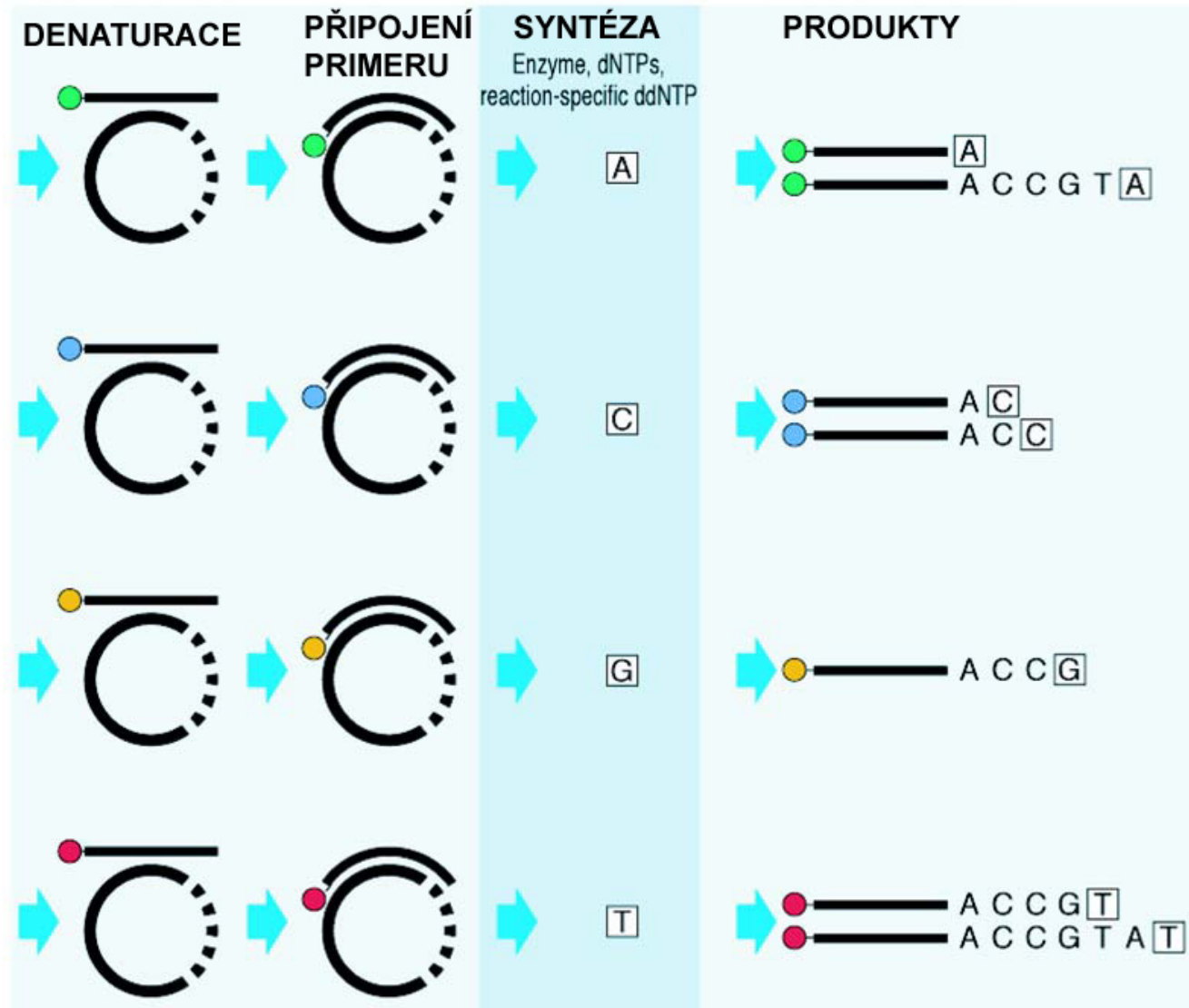
Automatické sekvenování DNA

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

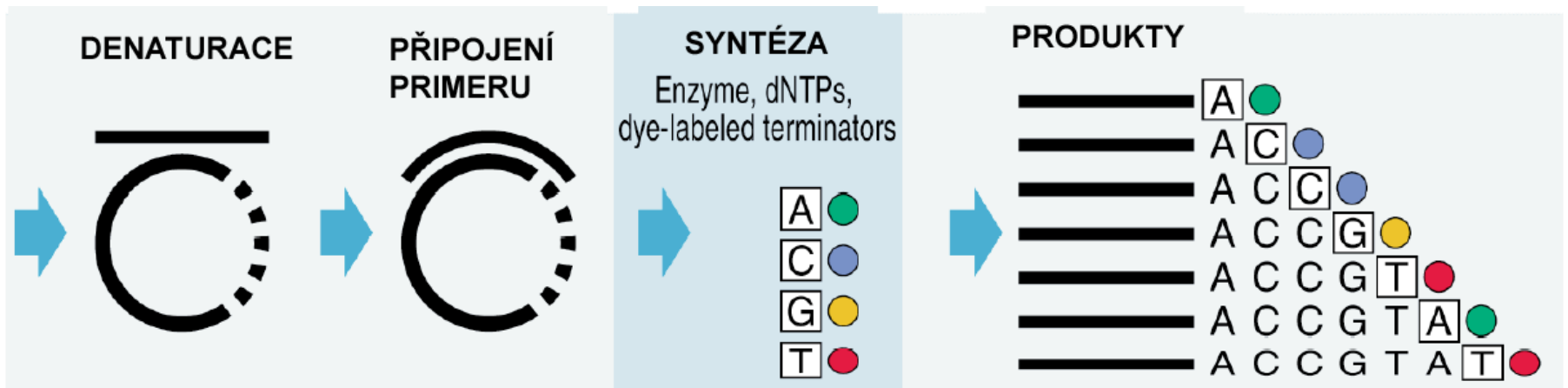
Asymetrická PCR pro sekvenování



Strategie barevných primerů

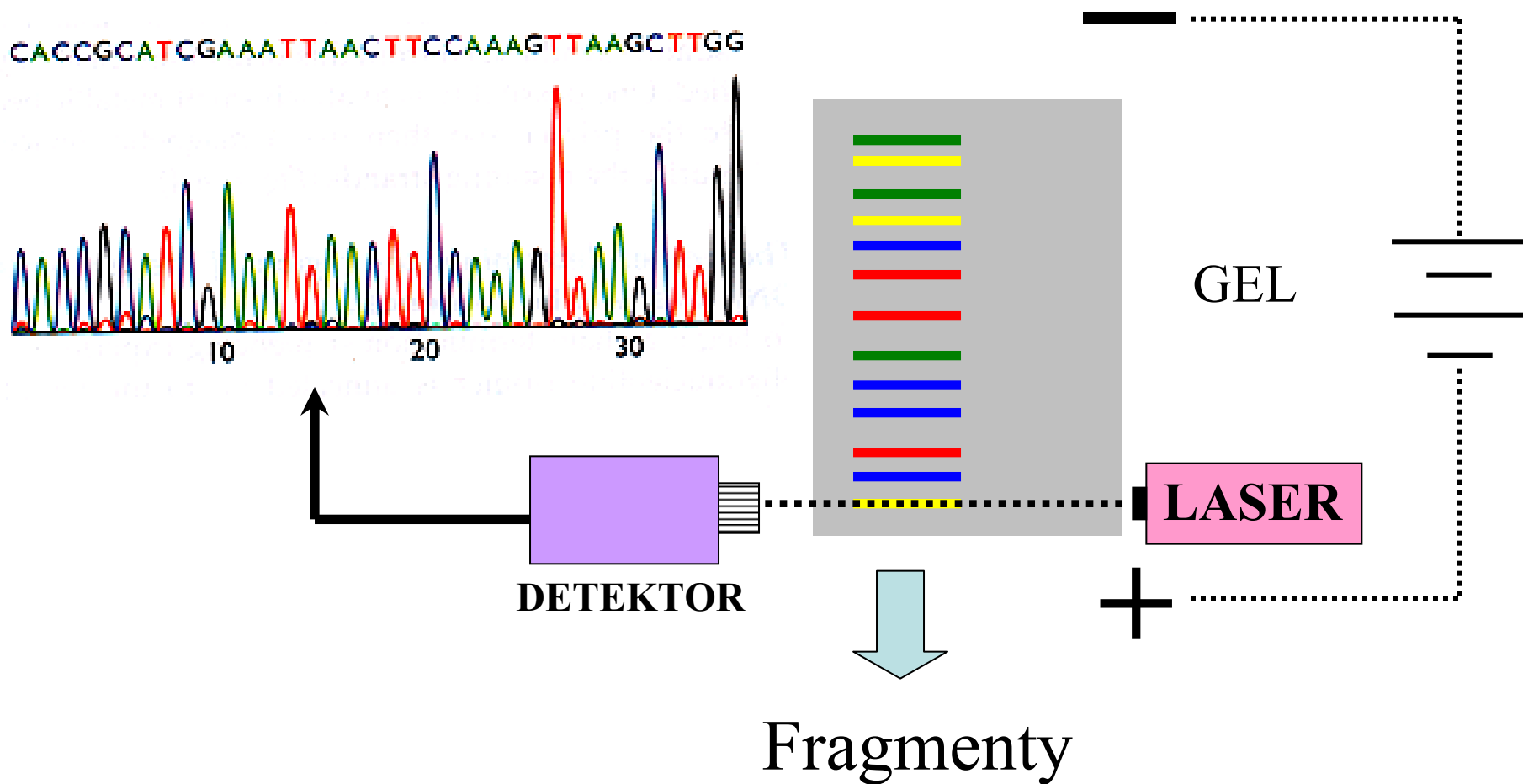


Strategie barevných terminátorů



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

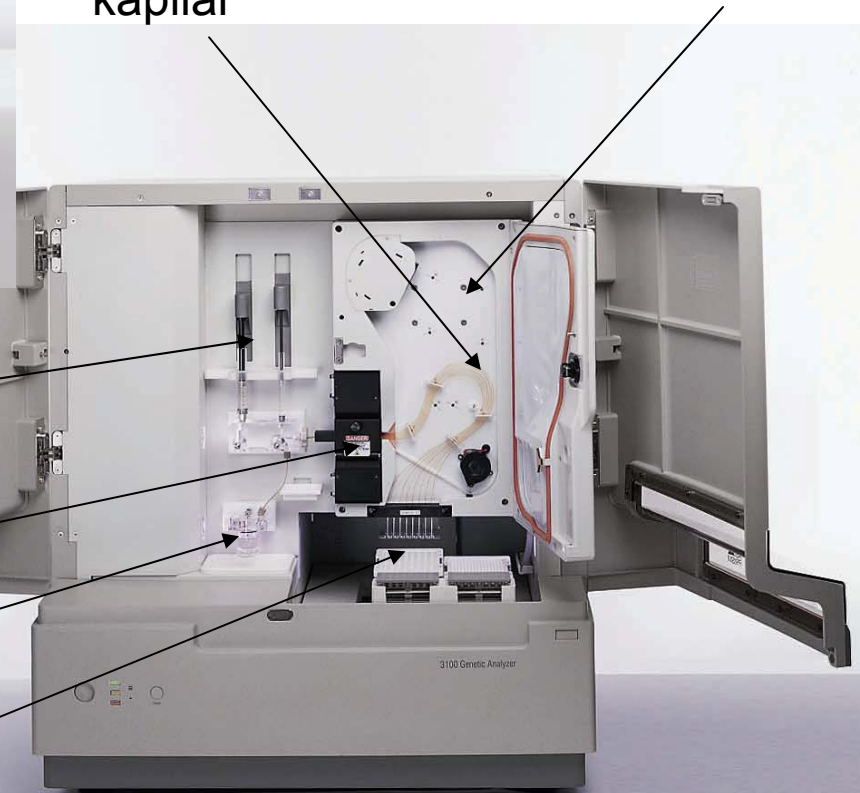
Vyhřívaná deska

Příprava gelu

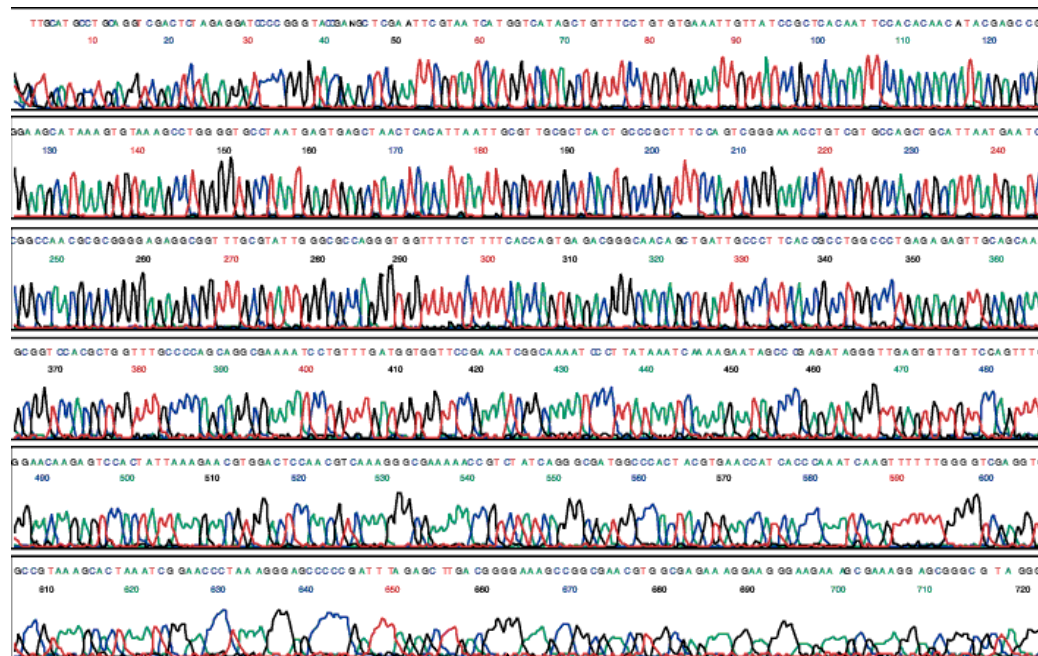
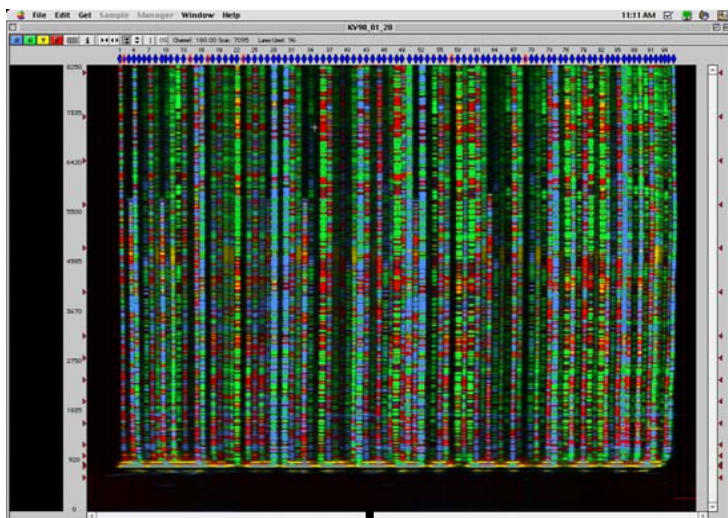
Laserový detektor

Rezervoár pufu

Automatické nanášení vzorku



Příklad výstupu



1 dráha na gelu

Sekvenování genomů

V praxi je velice často potřeba stanovit sekvenci fragmentu DNA, který je delší než průměrná délka 500 – 1 000 bází dosahovaná v jedné reakci.

K tomuto účelu sekvenování genomů mohou být zvoleny dvě zcela odlišné strategie:

- náhodné sekvenování
- uspořádané sekvenování sousedních úseků

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+} .

- Předpokládá se, že celková informace o sekvenci obsažená v připravených malých klonech odpovídá původní DNA a sekvence fragmentů jednotlivých klonů se vzájemně překrývají.
- Pomocí univerzálních sekvenačních primerů připojujících se k vektoru poblíž klonovacího místa jsou stanoveny sekvence krátkých úseků na koncích klonovaných fragmentů (minimálně 500 bází).
- Stanovené sekvence jsou pak použity k uspořádání klonovaných fragmentů z jednotlivých vektorů do souvislých sekvencí genomové DNA - kontigů.



Izolace DNA



Fragmentace

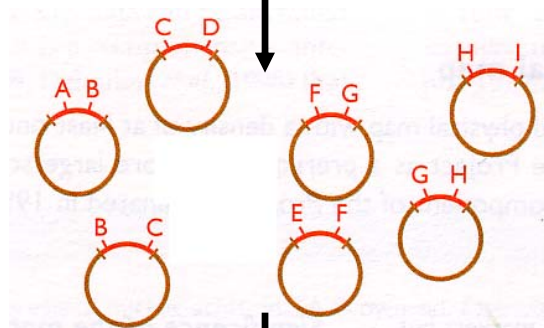


+



Vektor

Úprava konců a klonování



Sestavení překrývajících se klonů

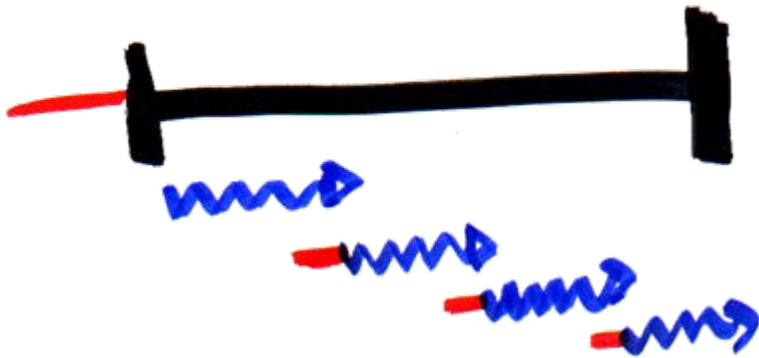


Uspořádané sekvenování

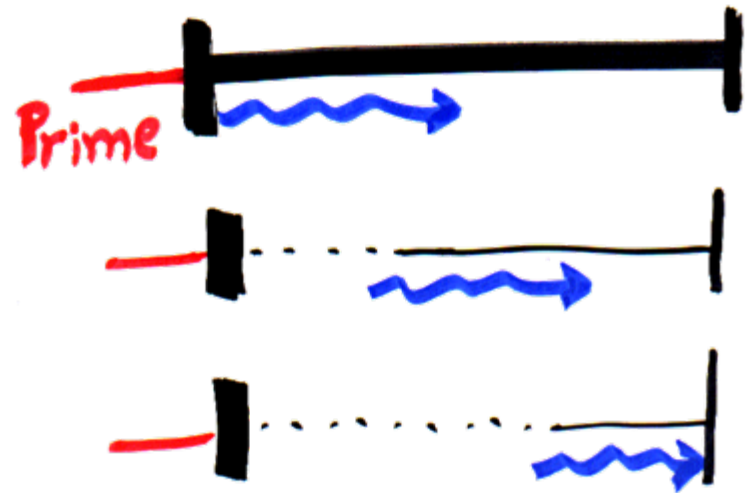
- Pro doplnění sekvence mezer zbývajících po náhodném sekvenování
- Pro sekvenování malých fragmentů DNA
- Dva odlišné přístupy:
 - **procházení primerem**
 - vyžaduje znalost sekvence, ke které se připojuje primer, který umožní prodloužení řetězce DNA-polymerázou.
 - získaná sekvence z první reakce je použita pro návrh primeru pro další reakci a tento krok se opakuje, dokud není dosaženo kompletního stanovení sekvence.
 - Tento proces nevyžaduje další klonování a minimalizuje stanovení nadbytečných sekvencí, ale správnost stanovené sekvence by měla být ověřena sekvenováním **obou řetězců**.
 - **postupné zkracování fragmentu exonukleázou a tvorba sousedících delecí**

Metody uspořádaného sekvenování

Procházení primerem

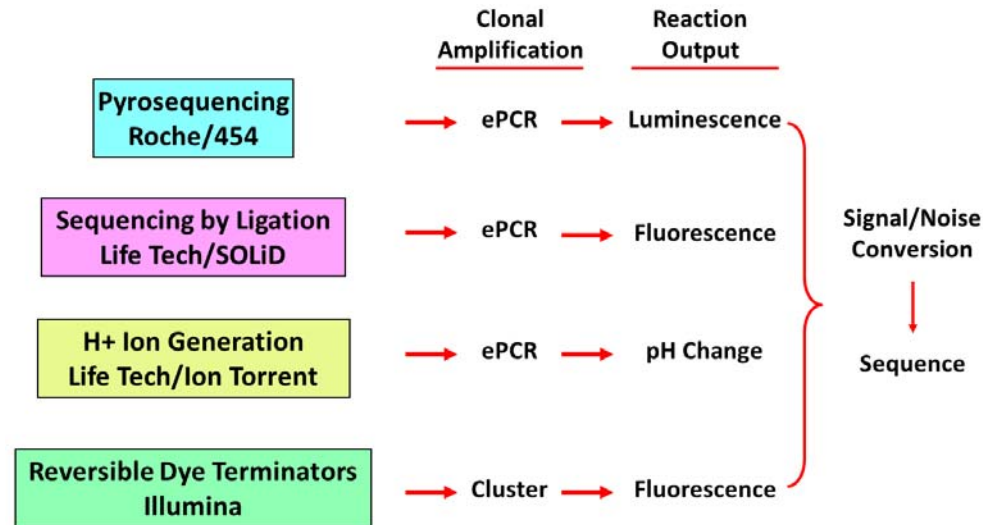


Sousední delece



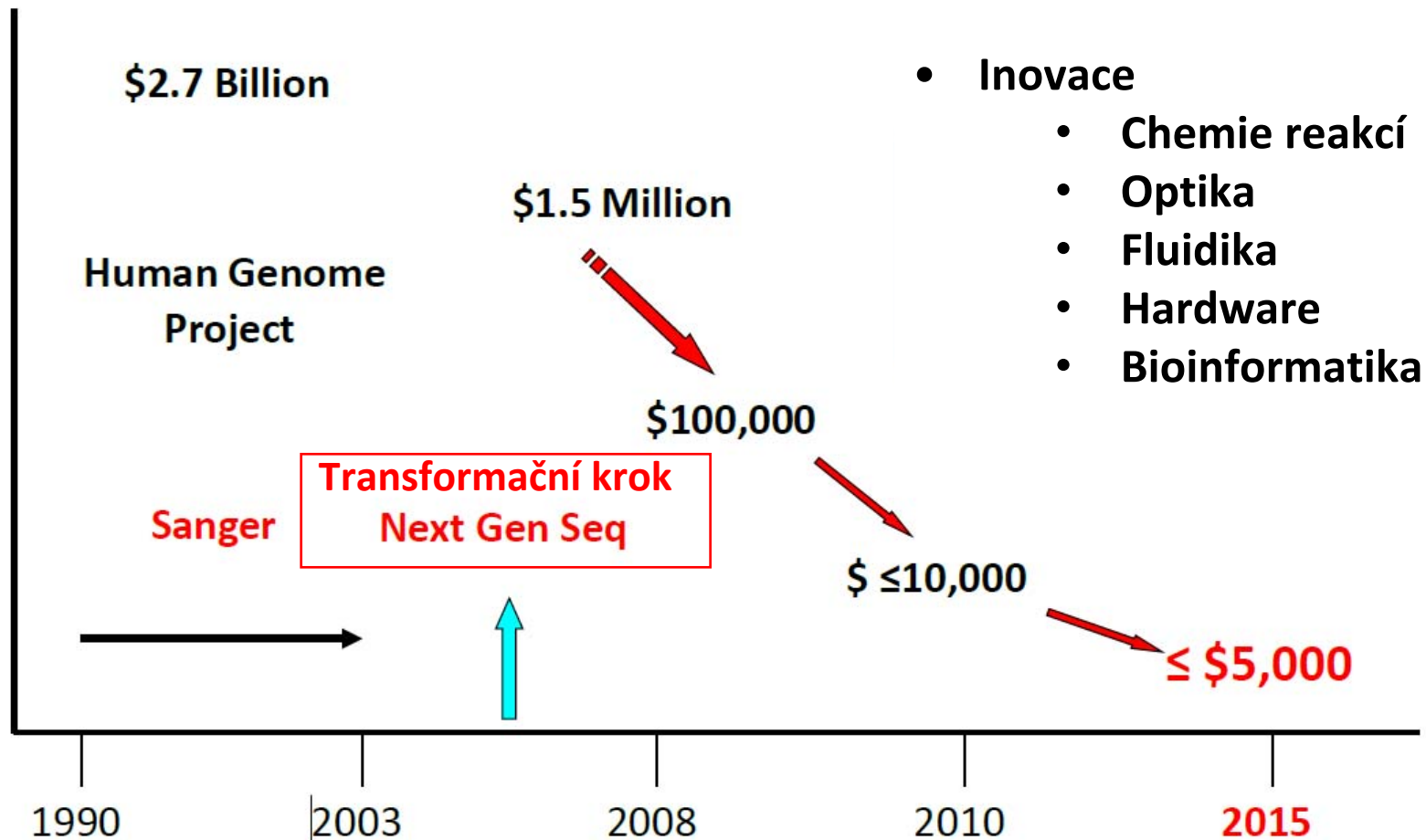
Metody sekvenování nové generace (next generation sequencing)

- 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
- Nové aplikace v klinické oblasti, vývoj kitů cílených na určité části genomů (dědičná onemocnění, nádorová onemocnění, metagenomika, 16S rRNA)



- Third Generation Sequencing
 - Pacific Biosciences
 - Helicos Biosciences
 - NABsys
 - VisiGen Biotechnologies
 - Oxford Nanophore Technologies

Vývoj ceny sekvenování na příkladu HGP



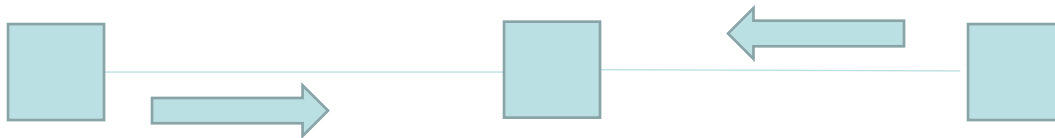
Typy uspořádání NGS sekvenování



Single Read

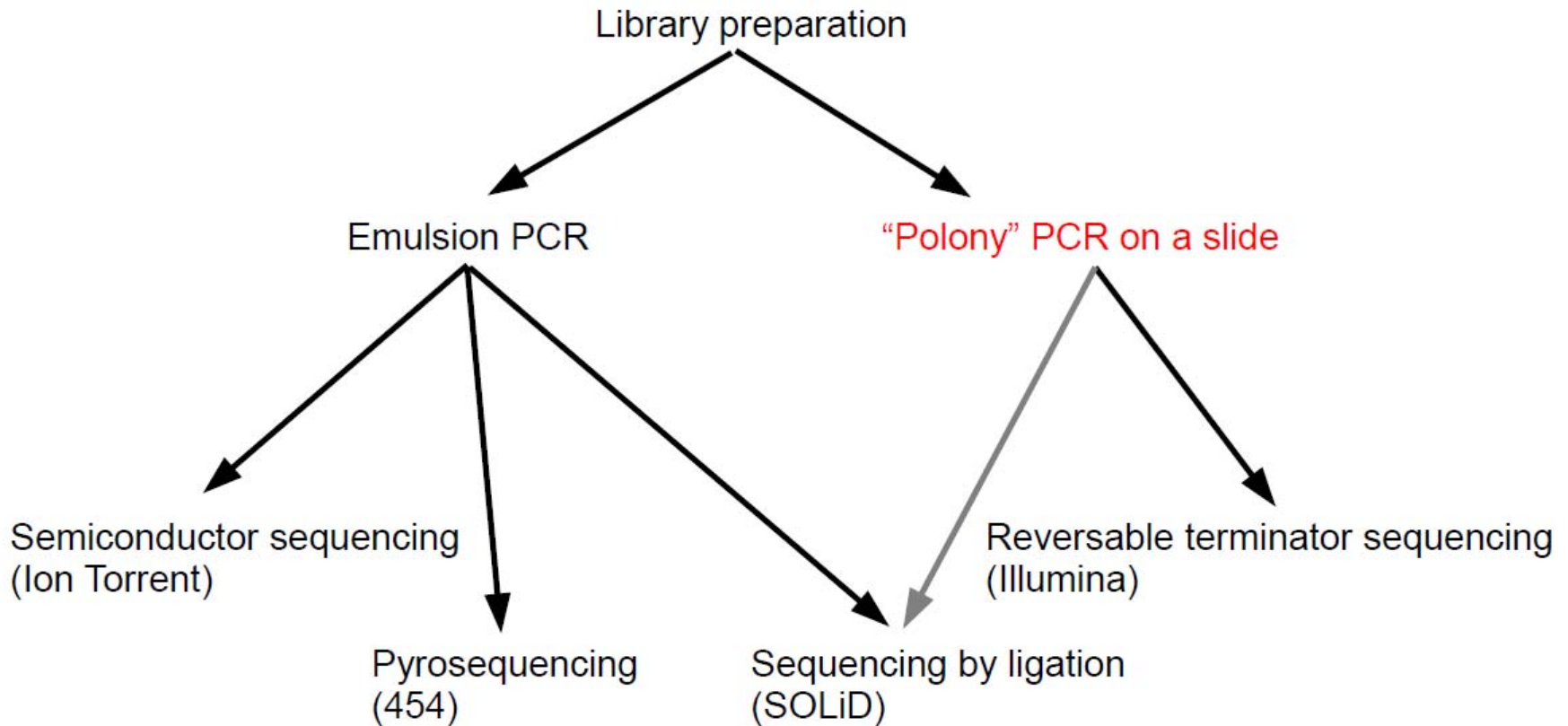


Paired-end read



Mate-pair read

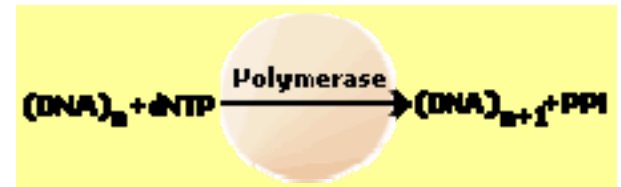
Metody přípravy knihovny



Pyrosekvenování

- Sekvenování se syntézou DNA v reálném čase nevyžadující elektroforézu ani separaci fragmentů
- Je založené na uvolnění pyrofosfátu (PPi) při enzymatické syntéze DNA (Nyren et al., 1987)
- 1. krok: Sekvenační primer hybridizuje k jednořetězcovému templátu a je inkubován s:

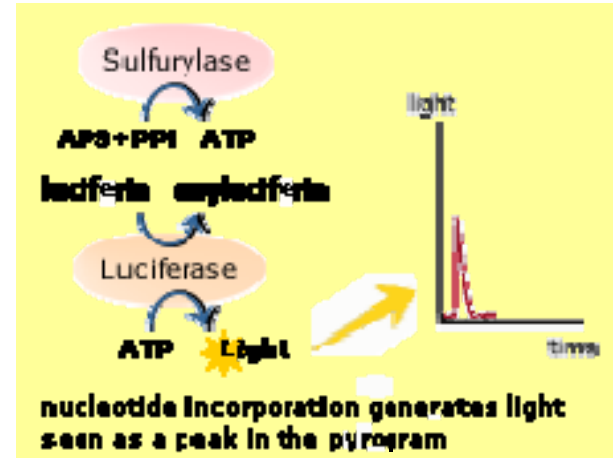
- DNA polymerázou
- ATP sulfurylázou
- Luciferázou
- Apyrázou
- substrátem, adenozin 5'-fosfosulfátem (APS)
- luciferinem



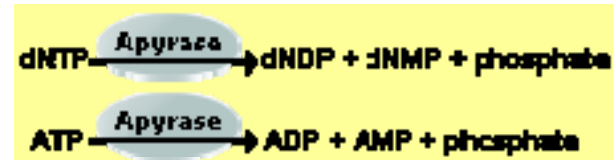
- 2. krok: První ze 4 dNTP – dATP je přidán k reakci
 - Pokud je na matrici komplementární báze, DNA polymeráza katalyzuje připojení nukleotidu k primeru
 - Pokud na matrici není komplementární báze nukleotid bude degradován apyrázou
 - Postupně budou přidány jeden po druhém všechny čtyři dNTP
 - Každé připojení nukleotidu je provázeno uvolněním pyrofosfátu (PPi) v množství ekvimolárním množství přidaného nukleotidu

- 3. krok: ATP sulfuryláza kvantitativně přeměňuje PPI na ATP za přítomnosti APS

- Vzniklý ATP umožní luciferázou zprostředkovanou konverzi luciferinu na oxyluciferin, který vytvoří světelný záblesk zaznamenaný detektorem fotonů a zobrazený jako pík na pyrogramu



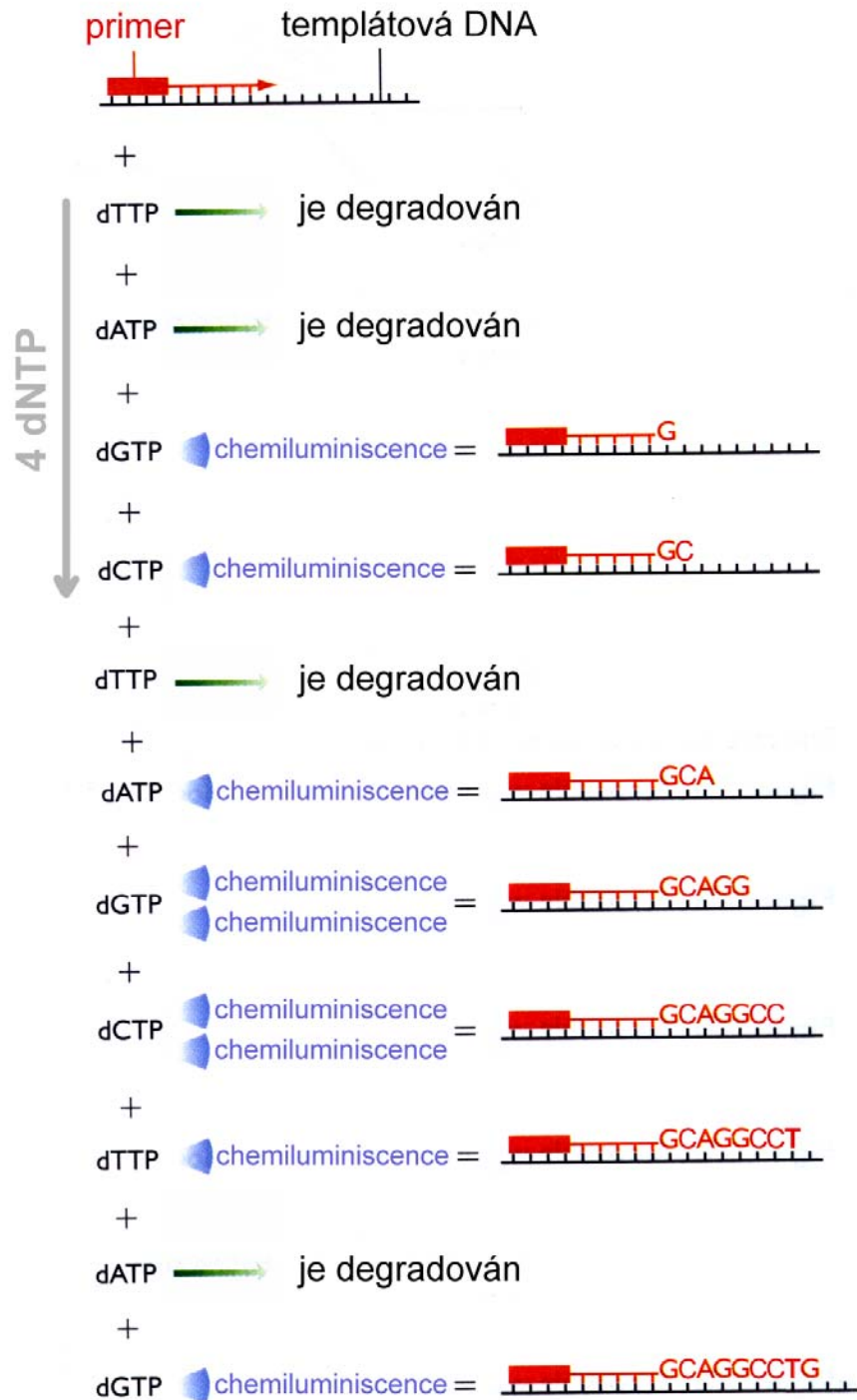
- 4. krok: Apyráza degraduje nepřípojené dNTP a nespotřebované ATP



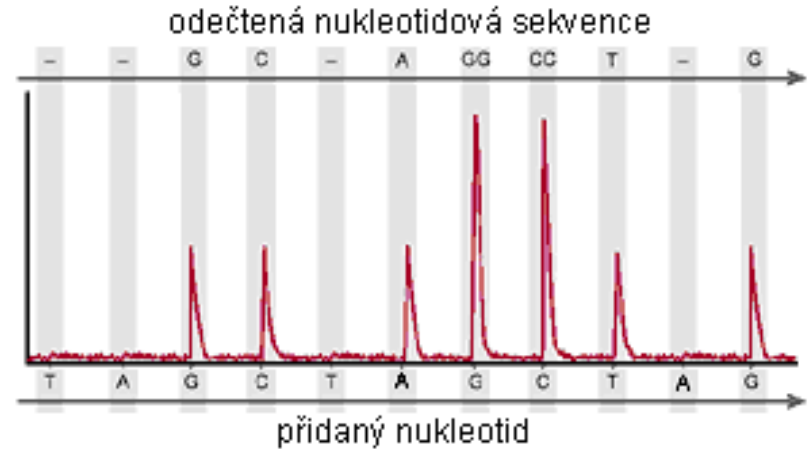
- Až je degradace kompletní je přidán další dNTP, který je v pořadí

- Proces se znovu opakuje a sekvence je odečítána z pyrogramu
- Namísto standardního dATP je používán α -thiosubstituovaný dATP, který je přijímán DNA polymerázou, ale nikoli luciferázou
- Metoda je ve vývoji a je používána pro identifikaci jednonukleotidových polymorfizmů (SNPs)

Princip pyrosekvenování

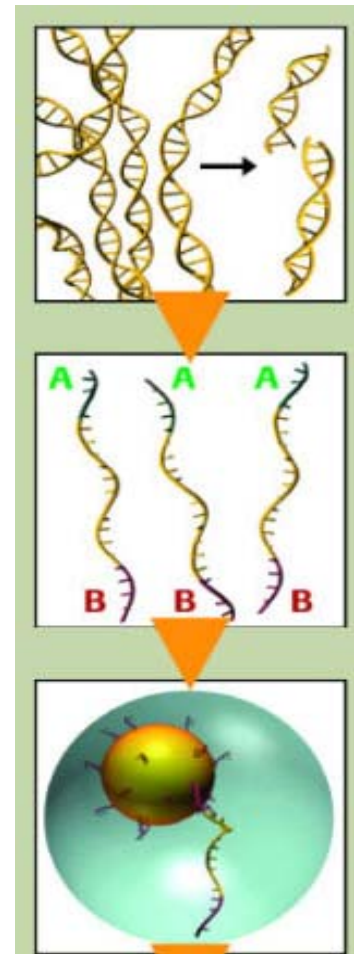


pyrogram



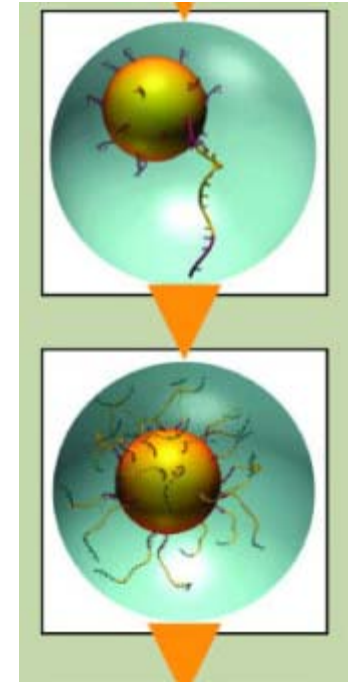
Klonální amplifikace knihovny emulzní PCR

- Příprava jednořetězcové DNA knihovny
 - Umožňuje zpracovat různé typy vzorků
 - genomové DNA
 - produkty PCR
 - BACs
 - cDNA
 - Frakcionace dlouhých úseků na 300- to 800-bp fragmenty
 - Vazba dvou adaptorů A a B – 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 (DNA Capture Beads) pokryté streptavidinem



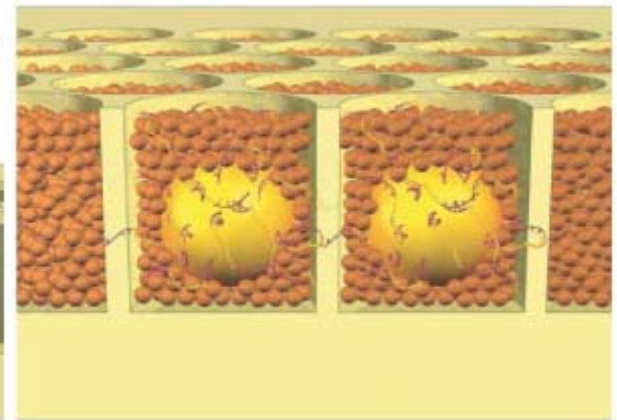
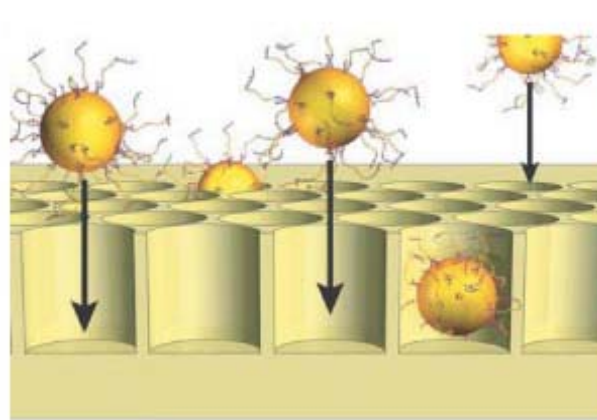
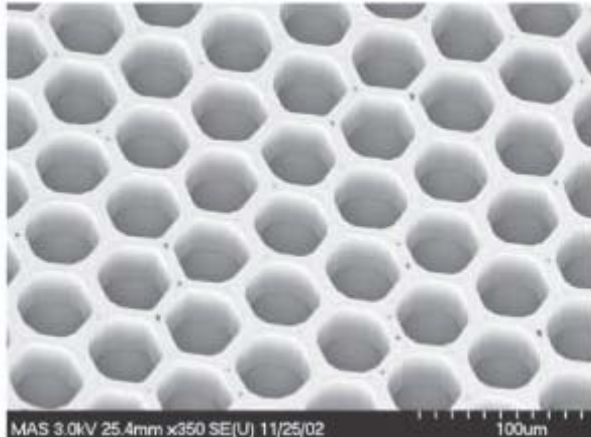
Klonální amplifikace knihovny emulzní PCR

- Separace kuliček a výběr pouze těch, které obsahují navázaný jediný fragment ssDNA
- Klonální amplifikace knihovny v emulzi
 - **emulzní PCR**, amplifikační reagencie ve směsi voda-olej → mikroreaktory obsahující jedinou kuličku s unikátním fragmentem DNA z knihovny - (10^7) kopií
- Pyrosekvenování
- Analýza dat s využitím bioinformatických nástrojů

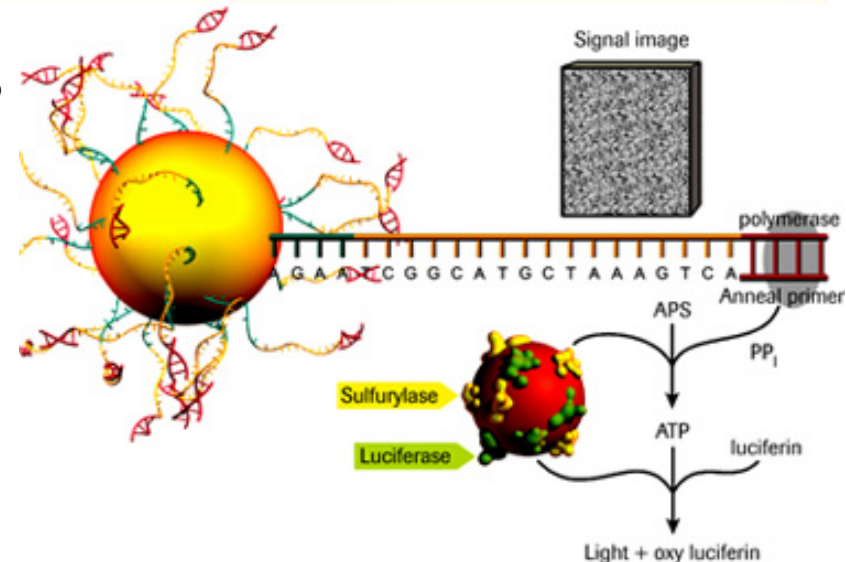


Sekvenátor FLX firmy Roche

- Pyrosekvenování (**One Bead = One Read**)
Kuličky se z emulze extrahují a jsou umístěny pomocí centrifugace do PicoTiterPlate, čipu z optických vláken o rozměrech 70 × 75 mm

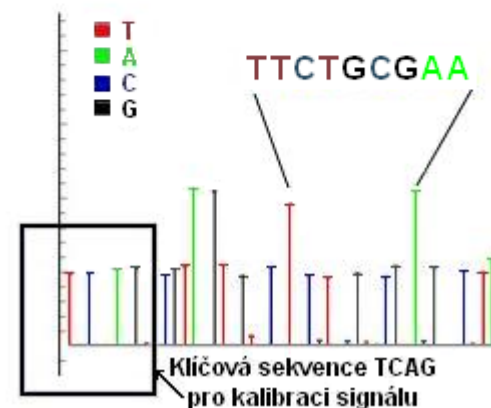
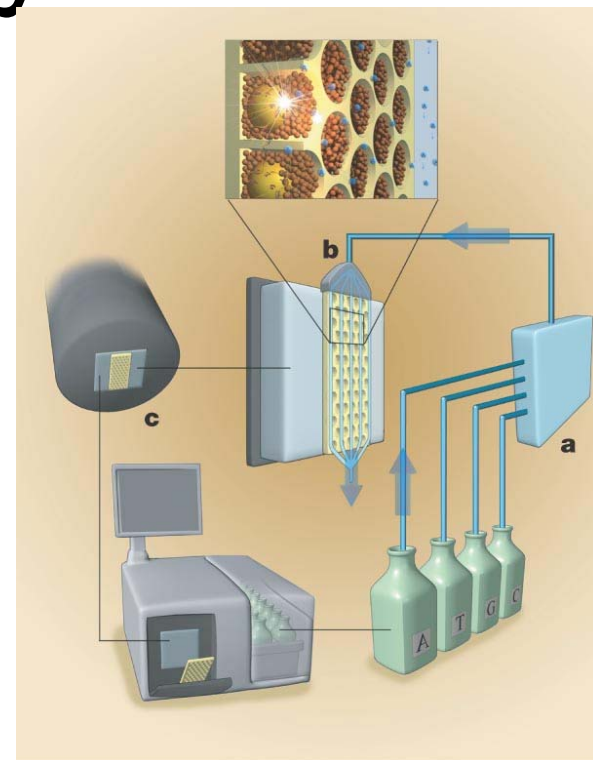


- Průměr jamek PicoTiterPlate dovoluje umístění pouze jedné kuličky průměru 28 μm
 - Na jednom čipu je 1 600 000 jamek
- Převrstvení směsí obsahující reagenty pro pyrosekvenování, enzymy jsou rovněž imobilizovány na malých mikrosférách
 - Spodní část čipu je v optickém kontaktu s dalšími optickými vlákny napojenými na CCD senzor - zachycení až 10000 emitovaných fotonů na 1 nukleotid



Sekvenátor FLX firmy Roche

- Kombinace vysoké intenzity signálu a pozičně specifické informace na mikrodestičce umožňuje současně analyzovat více než 1 milion sekvenačních běhů za 10 hod.
 - Délka stanovené sekvence 400 bp
 - Stanovení až 400 Mbp *de novo*
 - Resekvenace genomů jakékoli velikosti
- Limitující faktory
 - Negativní posuny čtecího rámce
 - 3'→5' exonukleázová aktivita DNA polymerázy
 - homopolymerní úseky
 - Pozitivní posuny čtecího rámce
 - Nedostatečná enzymatická aktivita apyrázy
 - Přesnost 99,5 % na prvních 250 bp



Sekvenátor FLX firmy Roche

- Paralelní analýza více vzorků
 - Adaptory obsahující sekvence MID (Multiplex Identifiers)
 - Až 12 různých unikátních sekvencí
 - Přidány během přípravy knihovny
 - Koamplifikovány s fragmenty DNA
 - Rozdělení mikrodestičky do 2, 4, 8 nebo 16 menších oblastí
 - Zabránění vzájemné kontaminace vzorků
 - Možnost sekvenovat současně až 192 různých vzorků DNA

GS Run Browser

GS Run Processor data set: D_2012_03_22_16_33_14_JR09100374_fullProcessing

Overview Wells Signals Reads Control DNA Filters

Well Categories

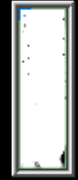
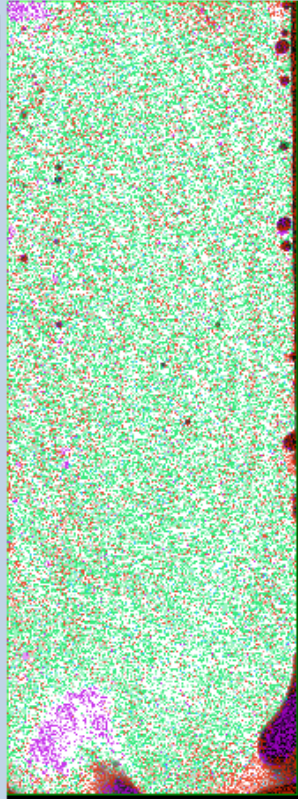
Status

- No Key
- Passed Filter (Library)
- Failed (Library)
- Control DNA

Flows

Show All

35	PPI
38	T
39	A
40	C
41	G
42	T
43	A
44	C
45	G
46	T
47	A
48	C
49	G
50	T
51	A
52	C
53	G
54	T



- Exit
- Open
- About
- Help

Results

GS Run Browser

GS Run Processor data set: D_2012_03_22_16_33_14_JR09100374_fullProcessing

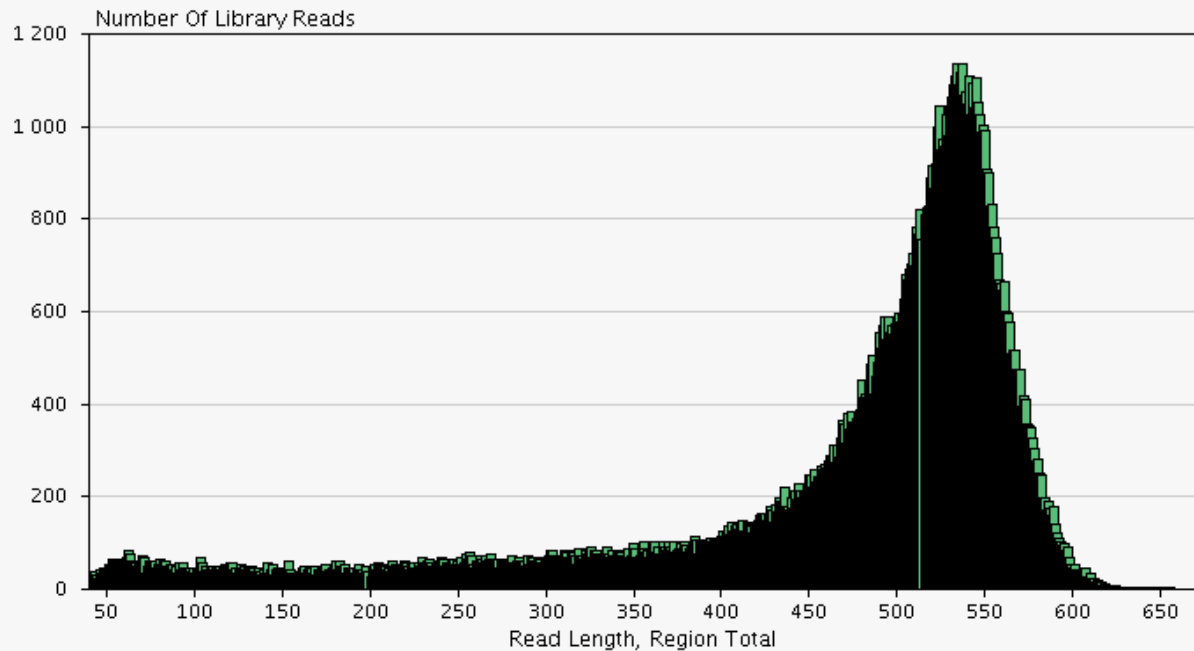
Overview Wells Signals Reads Control DNA Filters

Read Attributes

- Read Length
- Base Quality

Well Categories

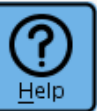
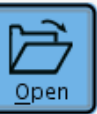
- GACT (Library)
- CATG (Control-Type I)
- ATGC (Control-Type II)



GACT (Library)

Region

	1	Total
Raw Wells	175 313	175 313
Key Pass Wells	158 132	158 132



GS De novo Assembler

Ready for analysis

Project: Stafal [Genomic]
Location: /home/LMDM/Plocha/analyza/Stafal

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. Go

Base left selected right + +

2 032 --- 2 132

```
TCTTCTCCTAAAAACC-TAAAGTATCAAGG-TTTTT-ACAAACCTCTACATT-AGGTAAGT-AACCGAAAGGTTCTACTAGAACTGTATATAAACTATTTGT
TCTTCTCCTAAAAACC-TAAAGTATCAAGG-TTTTT-ACAAACCTCTACATT-AGGTAAGT-AACCGAAAGGTTCTACTAGAACTGTATATAAACTATTTGT
TCTTCTCCTAAAAACC-TAAAGTATCAAGG-TTTTT-ACAAACCTCTACATT-AGGTAAGT-AACCGAAAGGTTCTACTAGAACTGTATATAAACTATTTGT
TCTTCTCCTAAAAACC-TAAAGTATCAAGG-TTTTT-ACAAACCTCTACATT-AGGTAAGT-AACCGAAAGGTTCTACTAGAACTGTATATAAACTATTTGT
TCTTCTCCTAAAAACC-TAAAGTATCAAGG-TTTTT-ACAAACCTCTACATT-AGGTAAGT-AACCGAAAGGTTCTACTAGAACTGTATATAAACTATTTGT
TCTTCTCCTAAAAACC-TAAAGTATCAAGG-TTTTT-ACAAACCTCTACATT-AGGTAAGT-AACCGAAAGGTTCTACTAGAACTGTATATAAACTATTTGT
TCTTCTCCTAAAAACC-TAAAGTATCAAGG-TTTTT-ACAAACCTCTACATT-AGGTAAGT-AACCGAAAGGTTCTACTAGAACTGTATATAAACTATTTGT
TCTTCTCCTAAAAACC-TAAAGTATCAAGG-TTTTT-ACAAACCTCTACATT-AGGTAAGT-AACCGAAAGGTTCTACTAGAACTGTATATAAACTATTTGT
TCTTCTCCTAAAAACC-TAAAGTATCAAGG-TTTTT-ACAAACCTCTACATT-AGGTAAGT-AACCGAAAGGTTCTACTAGAACTGTATATAAACTATTTGT
TCTTCTCCTAAAAACC-TAAAGTATCAAGG-TTTTT-ACAAACCTCTACATT-AGGTAAGT-AACCGAAAGGTTCTACTAGAACTGTATATAAACTATTTGT
TCTTCTCCTAAAAACC-TAAAGTATCAAGG-TTTTT-ACAAACCTCTACATT-AGGTAAGT-AACCGAAAGGTTCTACTAGAACTGTATATAAACTATTTGT
TCTTCTCCTAAAAACC-TAAAGTATCAAGG-TTTTT-ACAAACCTCTACATT-AGGTAAGT-AACCGAAAGGTTCTACTAGAACTGTATATAAACTATTTGT
TCTTCTCCTAAAAACC-TAAAGTATCAAGG-TTTTT-ACAAACCTCTACATT-AGGTAAGT-AACCGAAAGGTTCTACTAGAACTGTATATAAACTATTTGT
TCTTCTCCTAAAAACC-TAAAGTATCAAGG-TTTTT-ACAAACCTCTACATT-AGGTAAGT-AACCGAAAGGTTCTACTAGAACTGTATATAAACTATTTGT
TCTTCTCCTAAAAACC-TAAAGTATCAAGG-TTTTT-ACAAACCTCTACATT-AGGTAAGT-AACCGAAAGGTTCTACTAGAACTGTATATAAACTATTTGT
TCTTCTCCTAAAAACC-TAAAGTATCAAGG-TTTTT-ACAAACCTCTACATT-AGGTAAGT-AACCGAAAGGTTCTACTAGAACTGTATATAAACTATTTGT
TCTTCTCCTAAAAACC-TAAAGTATCAAGG-TTTTT-ACAAACCTCTACATT-AGGTAAGT-AACCGAAAGGTTCTACTAGAACTGTATATAAACTATTTGT
TCTTCTCCTAAAAACC-TAAAGTATCAAGG-TTTTT-ACAAACCTCTACATT-AGGTAAGT-AACCGAAAGGTTCTACTAGAACTGTATATAAACTATTTGT
TCTTCTCCTAAAAACC-TAAAGTATCAAGG-TTTTT-ACAAACCTCTACATT-AGGTAAGT-AACCGAAAGGTTCTACTAGAACTGTATATAAACTATTTGT
TCTTCTCCTAAAAACC-TAAAGTATCAAGG-TTTTT-ACAAACCTCTACATT-AGGTAAGT-AACCGAAAGGTTCTACTAGAACTGTATATAAACTATTTGT
TCTTCTCCTAAAAACC-TAAAGTATCAAGG-TTTTT-ACAAACCTCTACATT-AGGTAAGT-AACCGAAAGGTTCTACTAGAACTGTATATAAACTATTTGT
TCTTCTCCTAAAAACC-TAAAGTATCAAGG-TTTTT-ACAAACCTCTACATT-AGGTAAGT-AACCGAAAGGTTCTACTAGAACTGTATATAAACTATTTGT
```

Exit

New

Open

Start

Stop

About

Help

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

Analysis messages

Ion Torrent polovodičové sekvenování

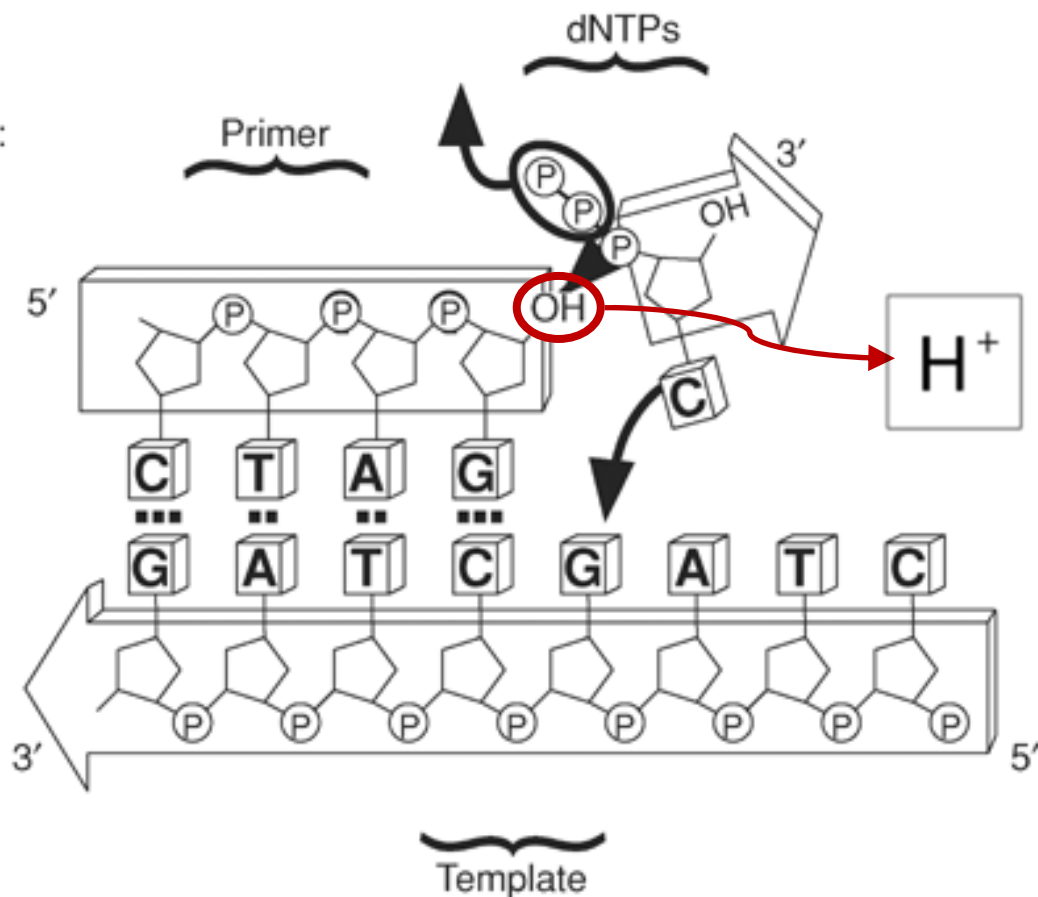
- prvním sekvenátor DNA, který **nepoužívá pro detekci sekvenovaných bází DNA světelný signál, který by byl uvolňovaný při enzymatických reakcích s fluorescenčními nebo chemiluminescenčními substráty.**
- Sekvenování Ion Torrent je založené na elektrochemické detekci vodíkových iontů (pH) které jsou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



Uvolnění vodíku v nepufřujících podmínkách



Example:






IonTorrent polovodičové sekvenování

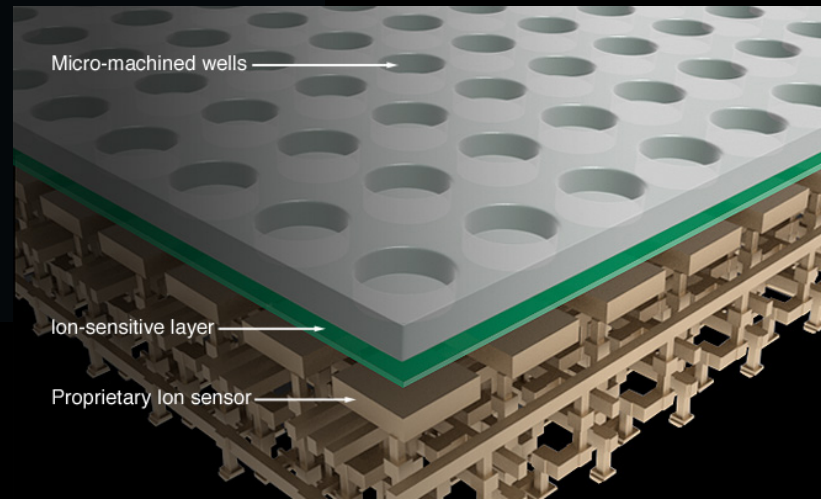
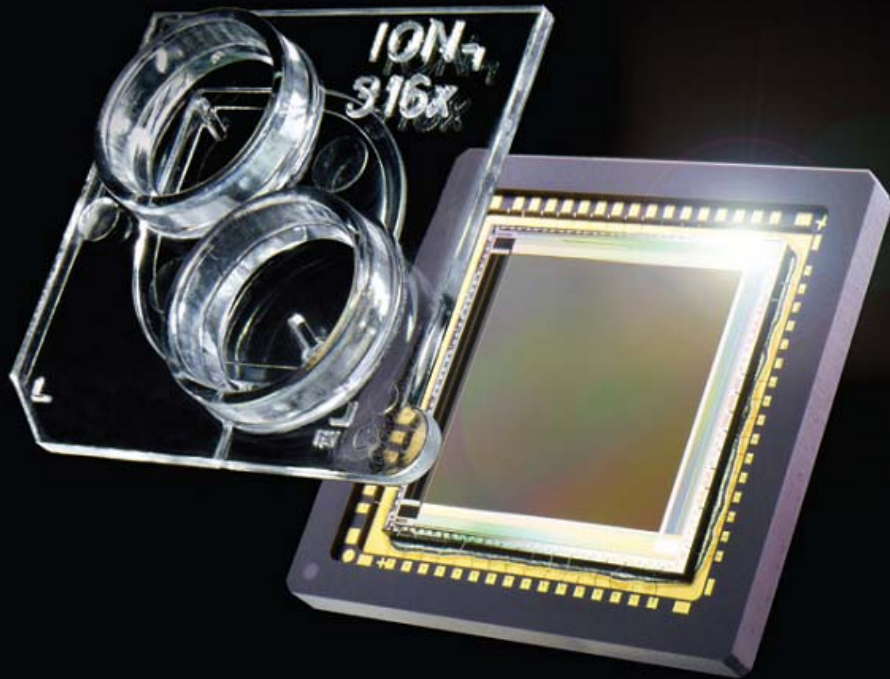
- Na čipu se nachází milióny jednotlivých reakčních cell (reaktorů), ve kterých probíhá sekvenační analýza individuálních kopií DNA na základě kontinuálního střídání reakčních složek (jednotlivých typů nukleotidů) v mikrofluidním systému.
- DNA imobilizovaná na mikrosférách (emulzní PCR)
- Kapacita závisí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

Ion PGM™ System

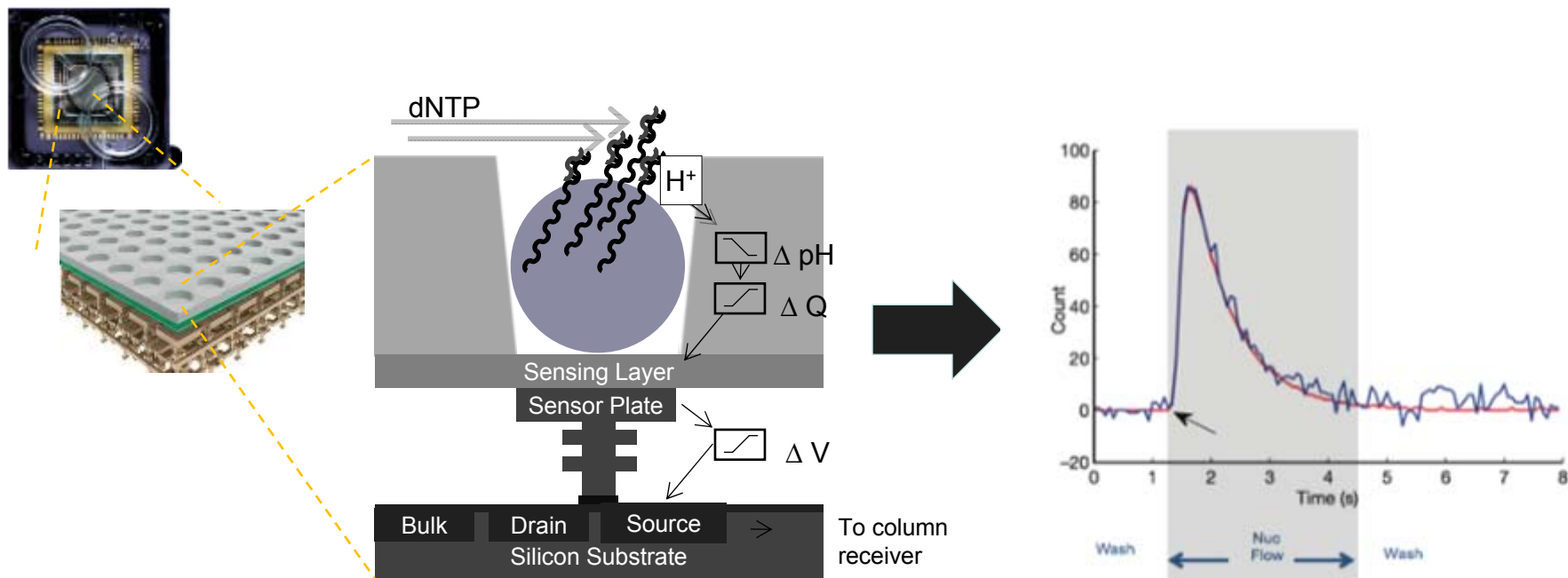


	Sequencing Run Time		Output*		Reads
	200-base reads	400-base reads	200-base reads	400-base reads	
Ion 314™ Chip v2 	2.3 hrs	3.7 hrs	30-50 Mb	60-100 Mb	400-550 thousand
Ion 316™ Chip v2 	3.0 hrs	4.9 hrs	300-600 Mb	600 Mb – 1 Gb	2-3 million
Ion 318™ Chip v2 	4.4 hrs	7.3 hrs	600 Mb – 1 Gb	1.2-2 Gb	4-5.5 million

IonTorrent čip



IonTorrent - detekce



Rothberg J.M. et al Nature doi:10.1038/nature10242

- Přímá detekce iontů vodíku a konverze na elektrický signál zpracovaný čipem

Ion Torrent polovodičové sekvenování

- Technologie Ion Torrentu je otevřená pro sekvenování DNA de-novo i cílené sekvenování vybraných oblastí genomu
- Minimální délka sekvenačního čtení
 - V jedno směru: 400bp
 - Obousměrné (Paired end)
 - Počet vzorků analyzovaných v jednom běhu
 - až 96 vzorků – pomocí označení tzv. barkodem
- Doba sekvenační analýzy
 - 2 - 3,5 hodiny – podle použitého čipu

SOLiD (Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection)

- Nová generace vysoce účinného sekvenování, dostupná od 2008 (Applied Biosystems)
- Založená na kombinaci metod
 - MPSS (Massively Parallel Signature Sequencing) [Brenner et al., 2000]
 - Multiplex Polony Sequencing [Shendure et al., 2005]
- Sekvenčně specifická ligace oktamerů oligonukleotidových sond označených fluorescenčními barvivy
- Průměrná délka sekvenovaného úseku je 30 až 40 bp
- Přesnost vyšší než 99,95 % na prvních 25 bp

SOLiD

- **Příprava jednoho ze dvou typů knihovny DNA**
 - Fragmentová knihovna (fragment library)
 - Párová knihovna (mate-paired library)

Fragmentová knihovna

adaptor P1

adaptor P2



sekvencovaná DNA

Párová knihovna

adaptor P1

vnitřní adaptor

adaptor P2

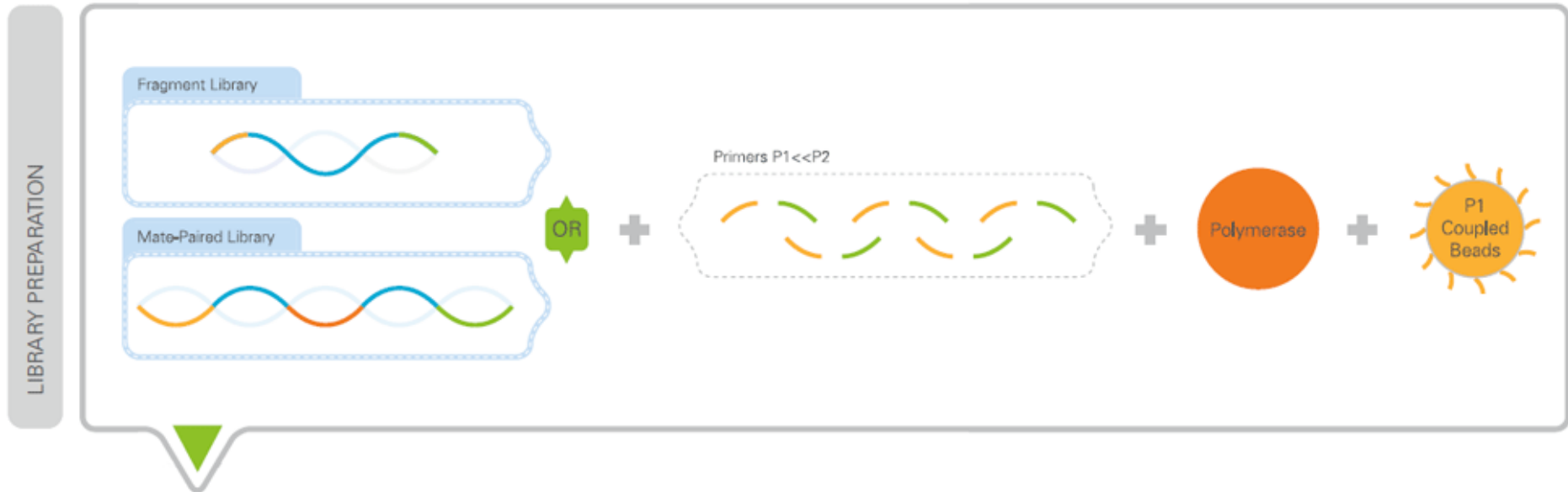


sekvencovaná DNA

sekvencovaná DNA

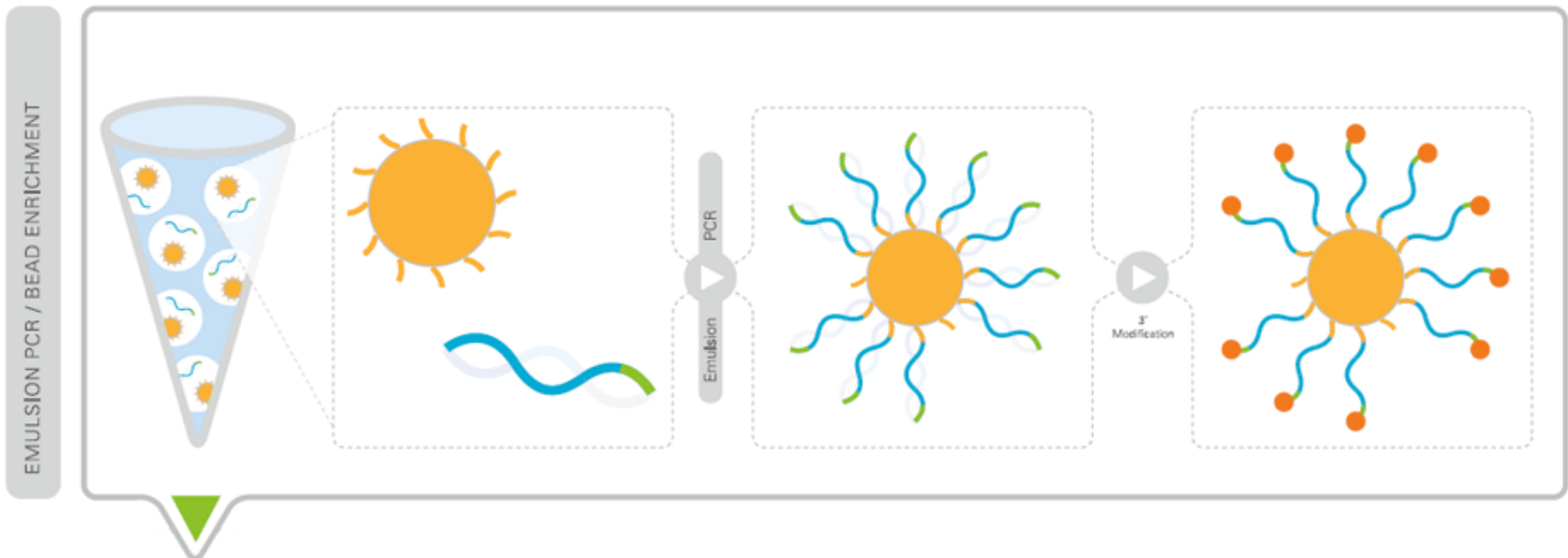
SOLiD

- **Amplifikace knihovny**
- PCR v emulzi
 - DNA knihovny
 - Primery P1 a P2
 - magnetické kuličky o velikosti 1 μm vázající DNA
 - DNA polymeráza a nukleotidy



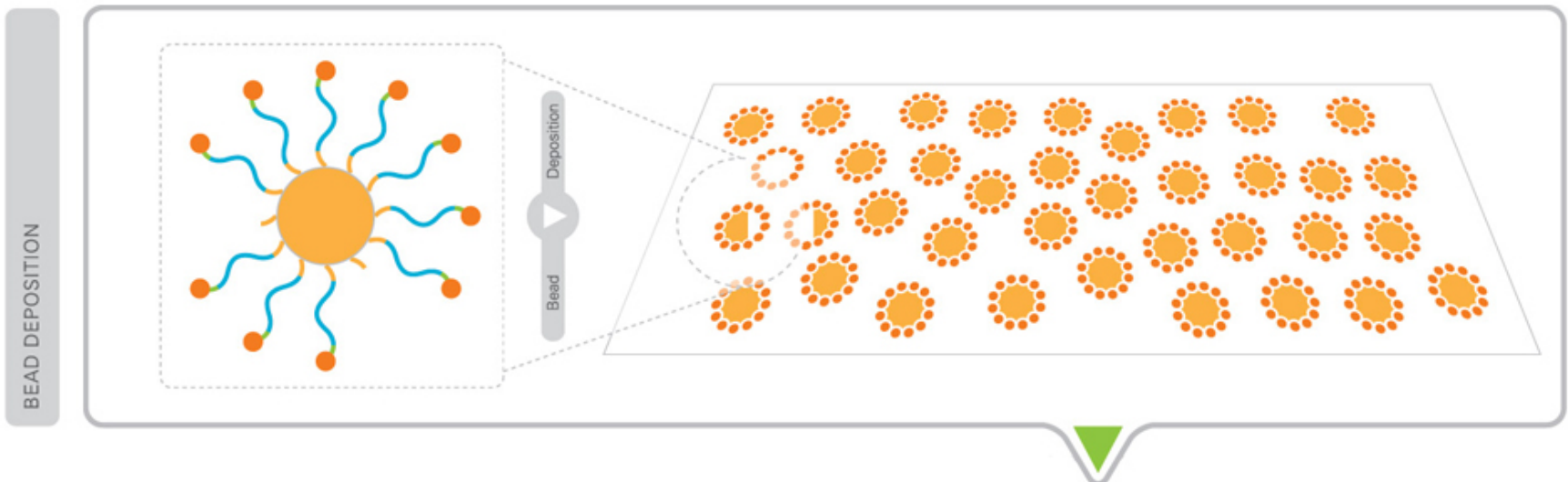
SOLiD

- Amplifikované templáty vázané na kuličkách
 - Denaturace templátů vázaných na kuličkách a odseparování nepoužitých kuliček



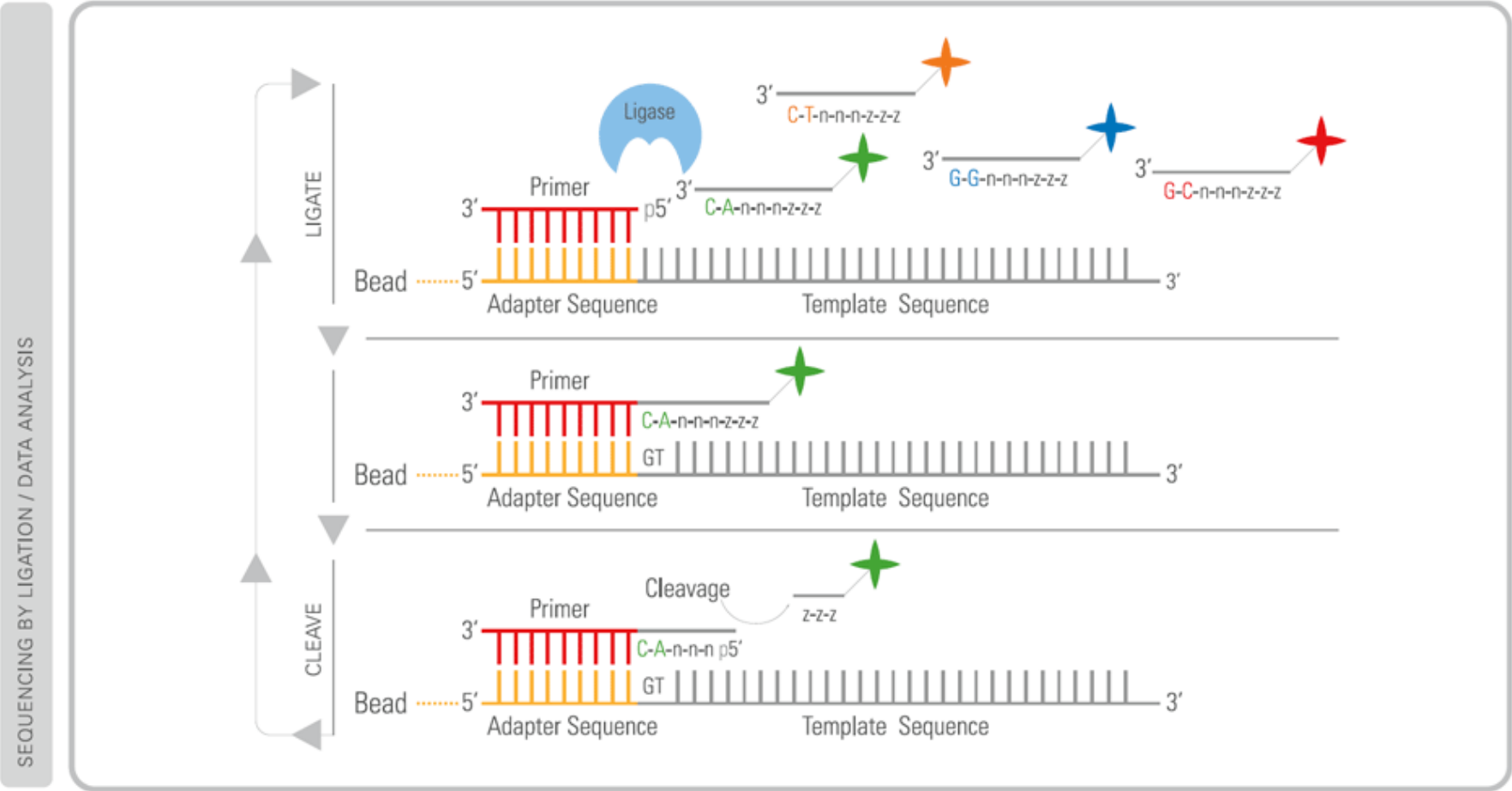
SOLiD

- Modifikace 3'-konců pro kovalentní vazbu na sklíčko pro sekvenování
- **Nanesení kuliček**
 - Sklíčko je rozděleno na pole umožňující oddělení vzorků do jedné, čtyř nebo osmi oblastí.
 - Klíčovou výhodou systému je možnost přípravy sklíček s velmi vysokou hustotou kuliček



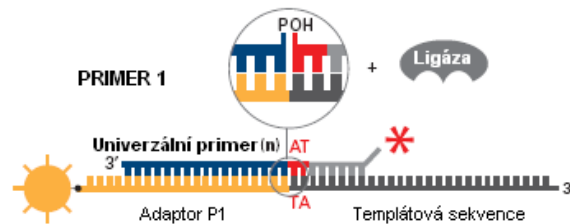
SOLiD

- Sekvenování prostřednictvím ligace

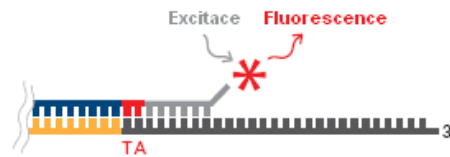


- Opakuje se několik cyklů (ligace, detekce, štěpení); počet cyklů určuje délku stanovené sekvence
- Po několika cyklech (7) je prodloužený produkt odstraněn a templát je resetován s primerem komplementárním k pozici n-1,
 - celkem je použito 5 primerů (n, n-1, n-2, n-3 a n-4)
 - Každá báze je integrována ve dvou nezávislých ligacích s použitím dvou primerů

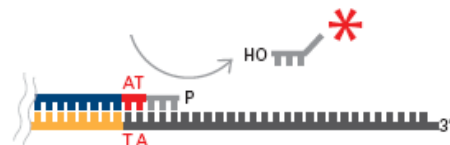
1. Navázání primeru, ligace sondy



2. Zachycení obrazu



3. Odštěpení fluorescenční části sondy

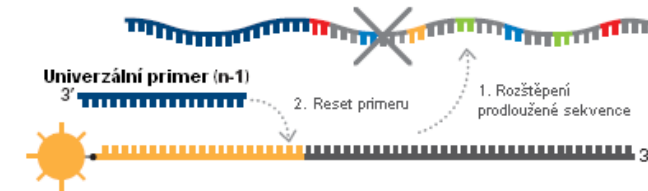


4. Opakování kroku 1 až 4

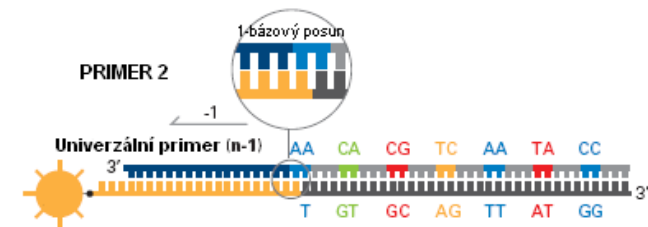
Vazebný cyklus 1 2 3 4 5 6 7 ... (n cyklů)



5. Reset primeru

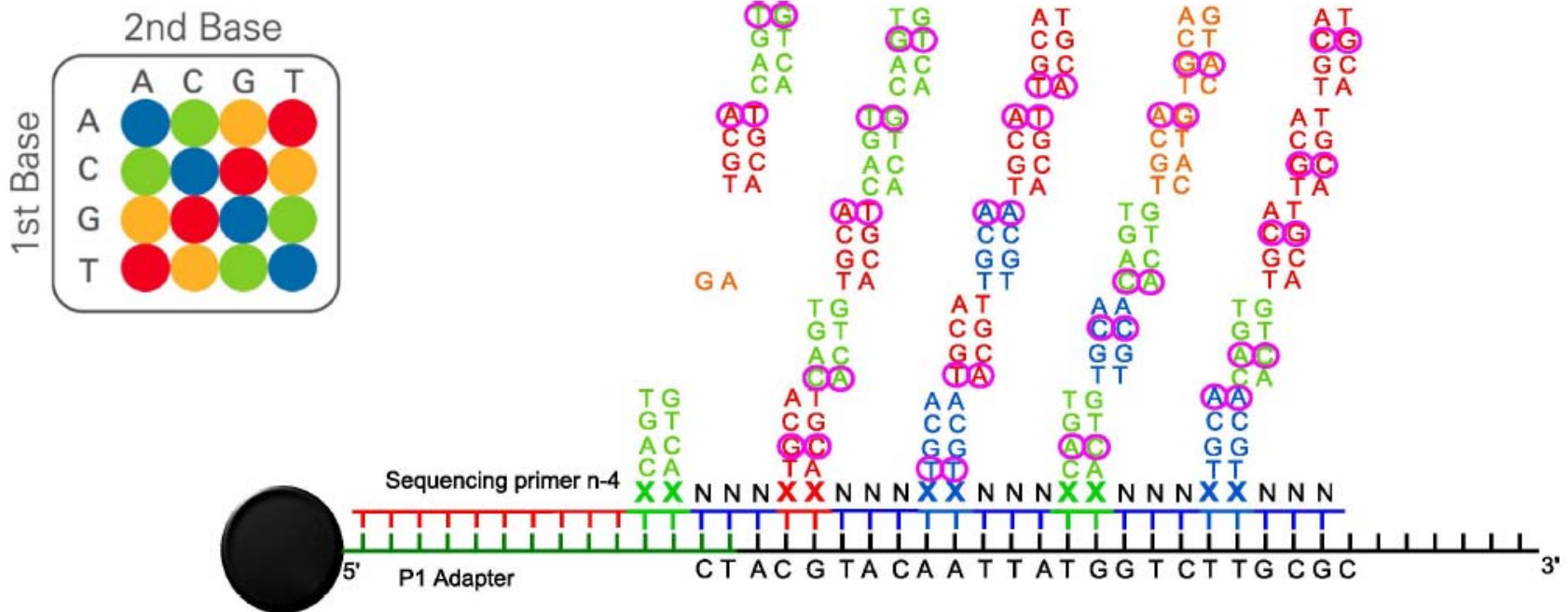


6. Opakování kroku 1 až 6 s novým primerem

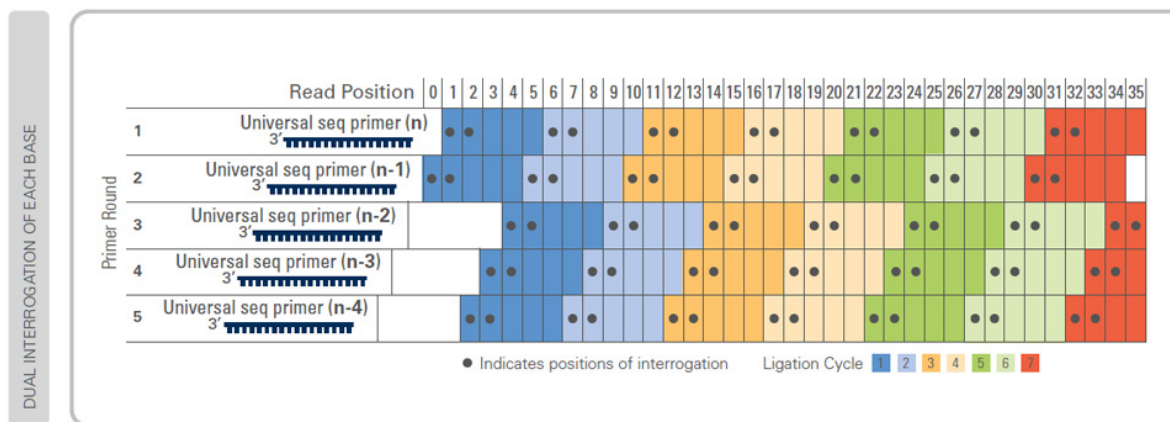


7. Opakování celého cyklu s primery n - 2, n - 3 a n - 4

SOLiD – čtení sekvence



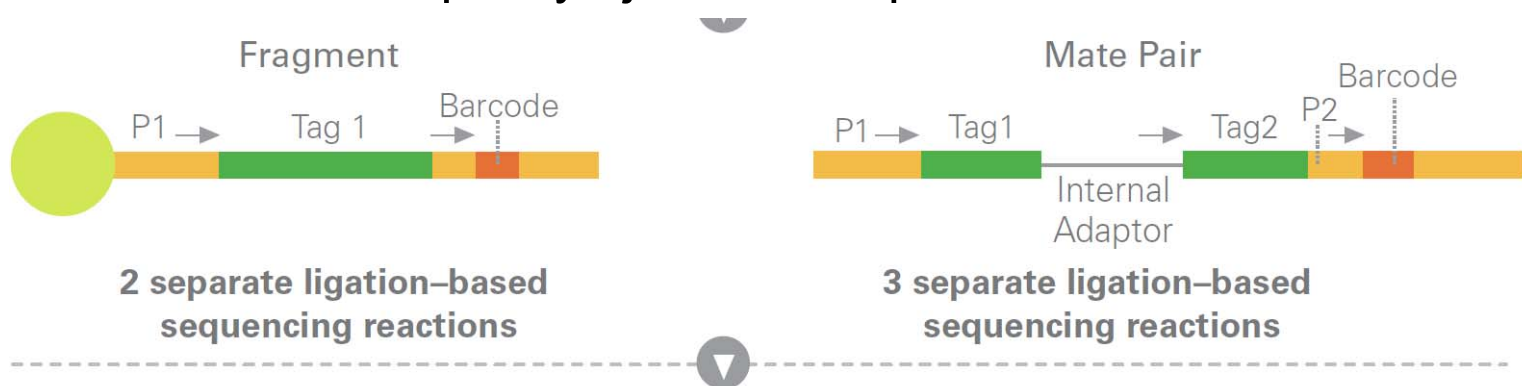
SOLiD – Pravidla a dešifrování barevného kódu



- Systém pracuje se 4 základními bázemi – A, C, G, T.
- Základní barvy jsou označeny 0, 1, 2 a 3 (modrá, zelená, žlutá a červená)
- Dvě odlišné dvojice bází, které mají stejnou počáteční bázi, se barví odlišnou barvou: barva (AC) ≠ barva (AG)
- Dvojice bází, které jsou reverzní, se barví stejnou barvou: barva (AC) = barva (CA)
- Dvojice stejných bází se barví stejnou barvou: barva (AA) = barva (CC)
- Dvojice bází, které jsou odlišné, ale mají stejnou druhou bázi, se barví odlišně: barva (AC) ≠ barva (GC)

SOLiD – paralelní analýza více vzorků

- SOLiD využívá šestnáct různých „kódů“ (barcoding) pro odlišení vzorků.
 - Vázány na 3'-konec sekvence pomocí modifikovaného adaptoru P2
 - Podobná teplota T_m
 - Nízké procento chyb
 - Unikátní v barevném kódu
 - Možnost současně analyzovat až 256 vzorků (při využití dvou sekvenačních destiček rozdělených na osm polí).
 - Metoda SOLiD poskytuje 9000 Mbp během 5 dnů



AGGTTCCGATACGGATTACCATGTG — Barcode 1
AGGTTCCGATACGGATGACCATGTG — Barcode 2

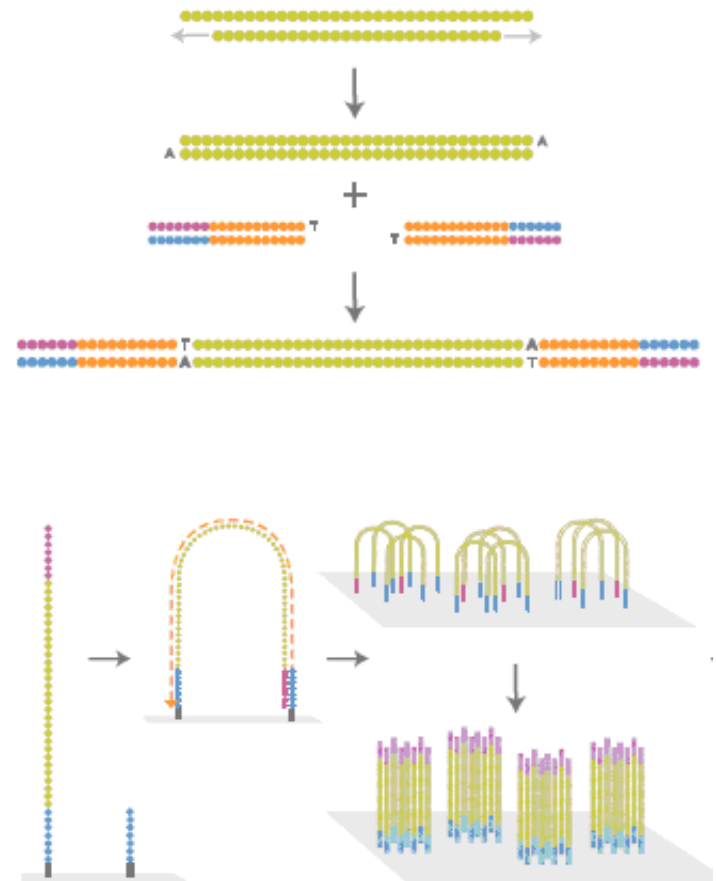
Technologie firmy Illumina/Solexa

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

Illumina/Solexa

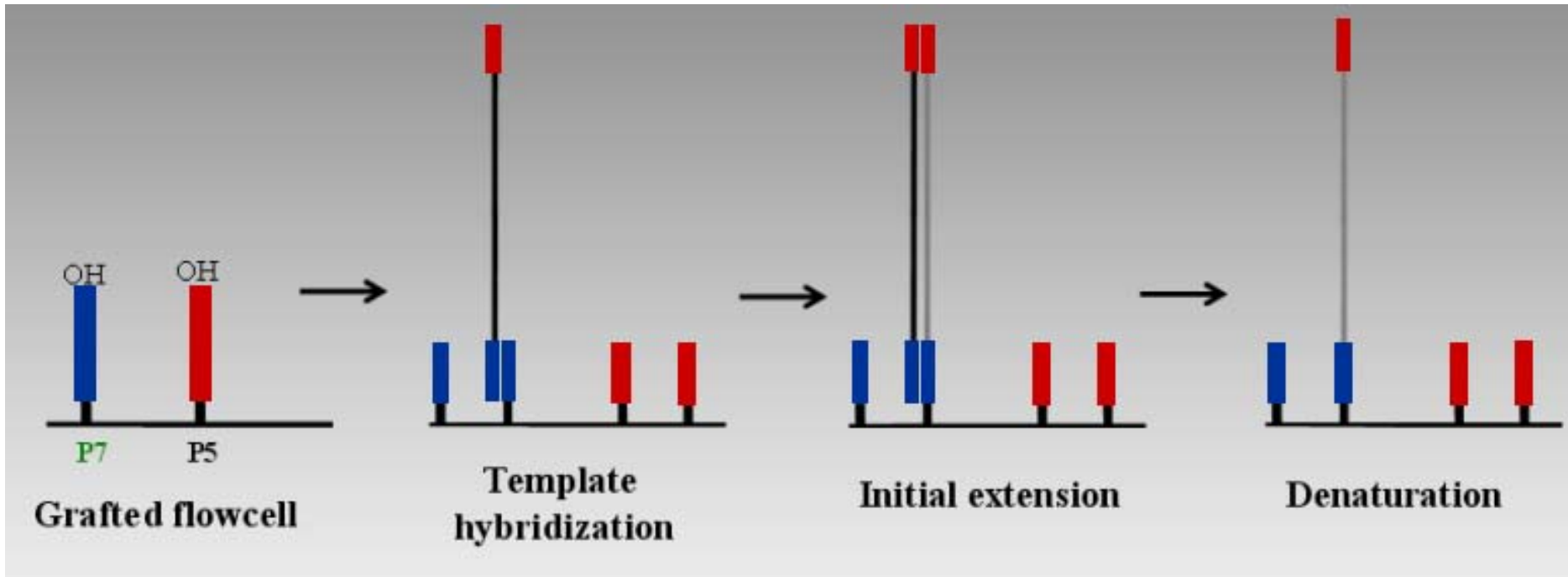
- **Příprava knihovny**

- 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

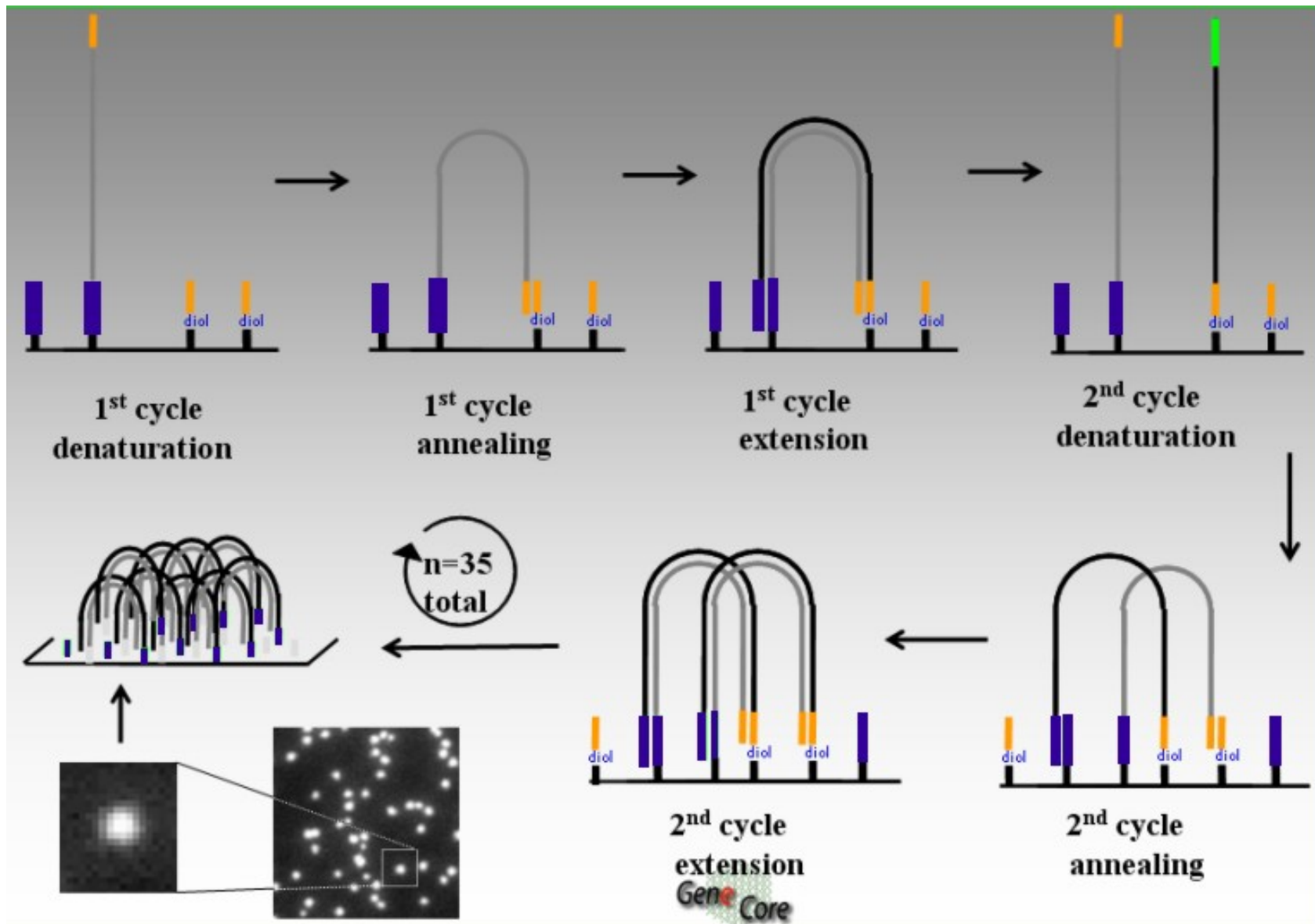




Bridge amplification: initiation

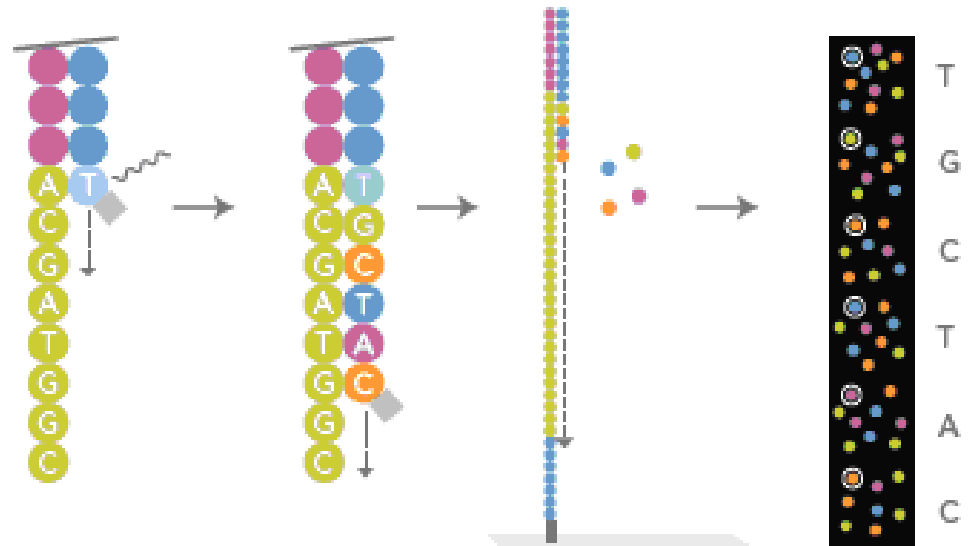


On the surface: complementary oligos



Illumina/Solexa

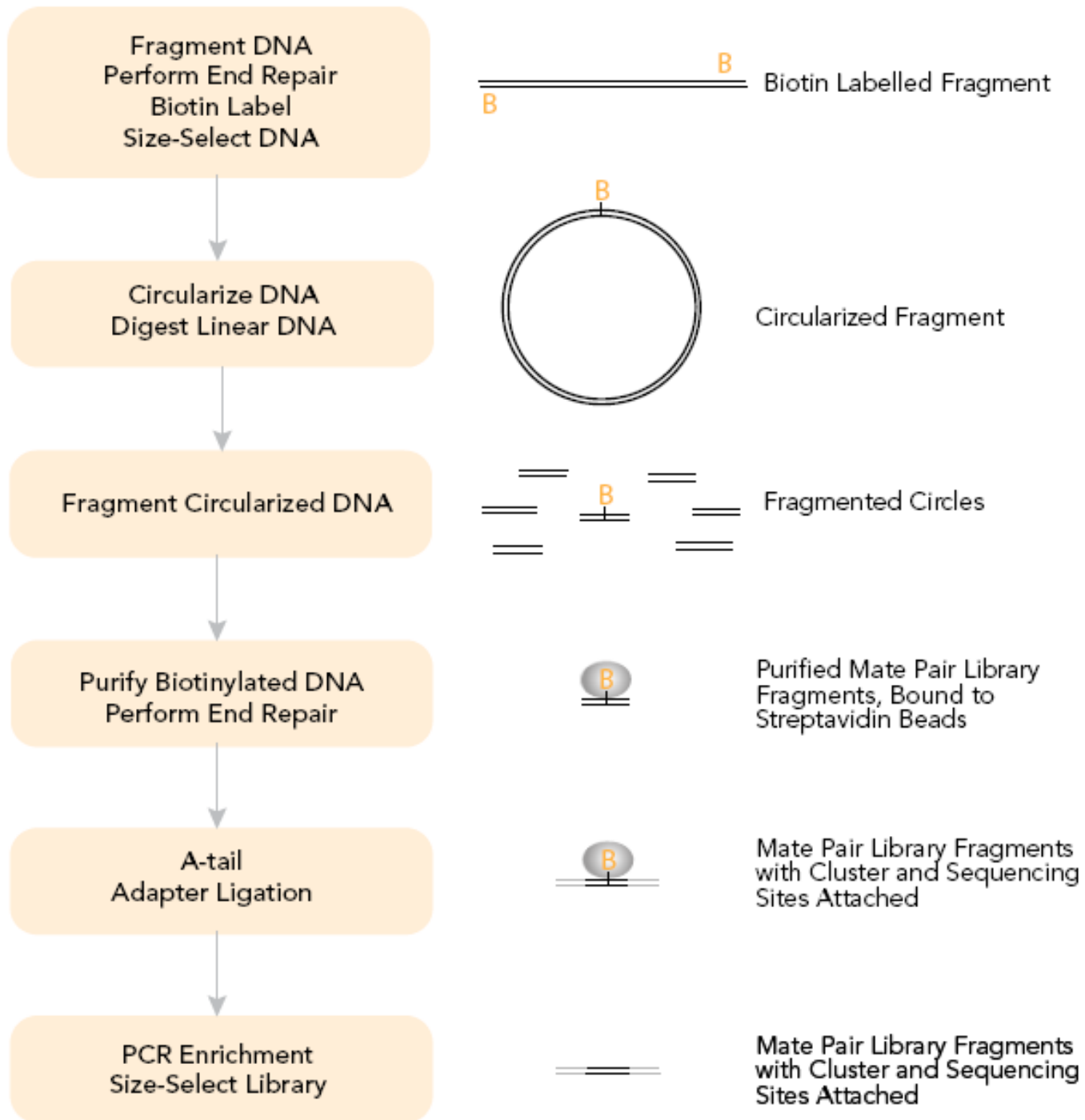
- **Průběh sekvenační reakce**
- Přidání primerů ve směsi s DNA polymerázou a fluorescenčně značenými dNTP
- Nukleotidy jsou na 3'-konci modifikovány tak, že umožňují reverzibilní ukončení prodlužujícího se řetězce DNA
- Je tak zajištěno, že se řetězec v každém cyklu prodlouží právě o jednu bázi.
- Po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





Illumina (Solexa) sequencing

Mate-pair sequencing



Illumina/Solexa

- Délka čtených úseků:
 - HiSeq : 100 nt or 150 nt
 - MiSeq : 250 nt
- Mnohonásobné pokrytí sekvence (30 x – 100 x)
- Možnost mnohonásobného sekvenování
 - Povrch sklíčka rozdělen do částí
 - Vzorky 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

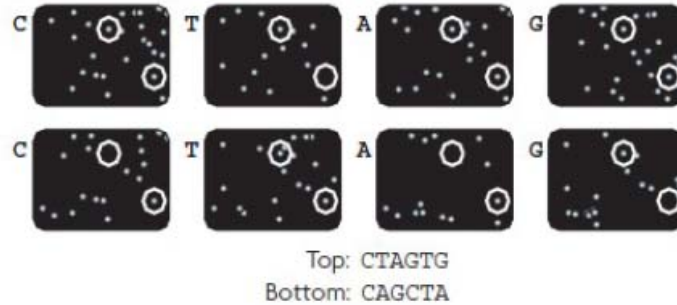
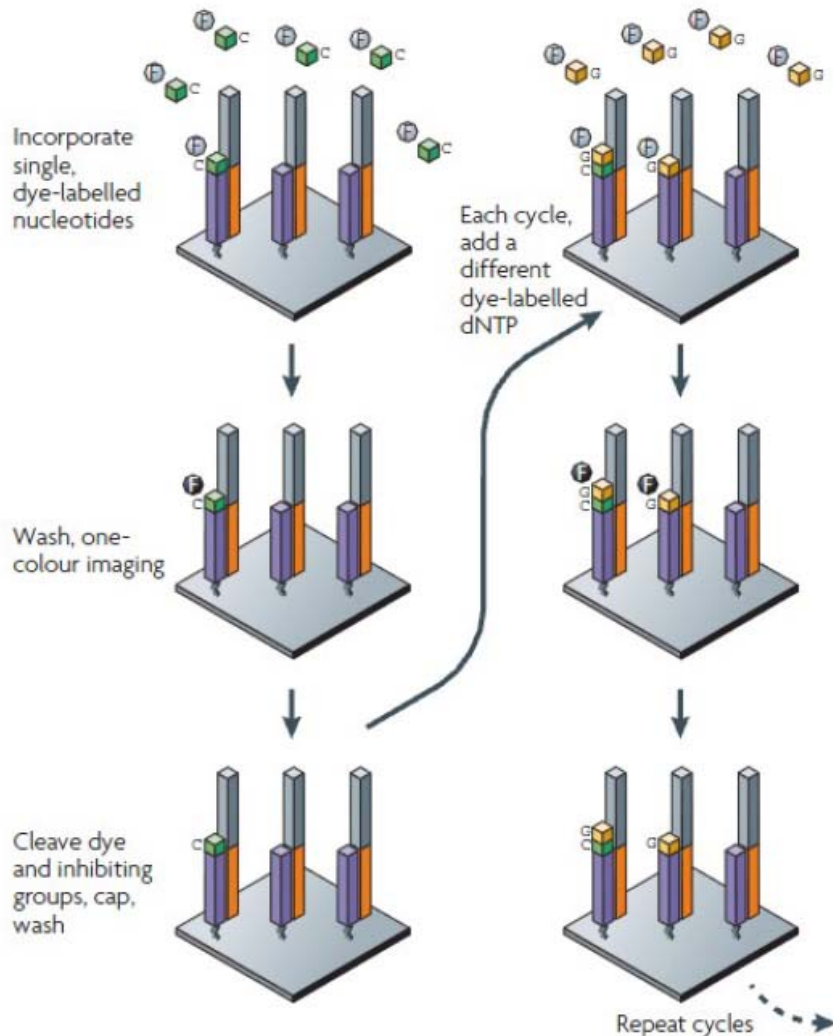
MiSeq



Sekvenování třetí generace

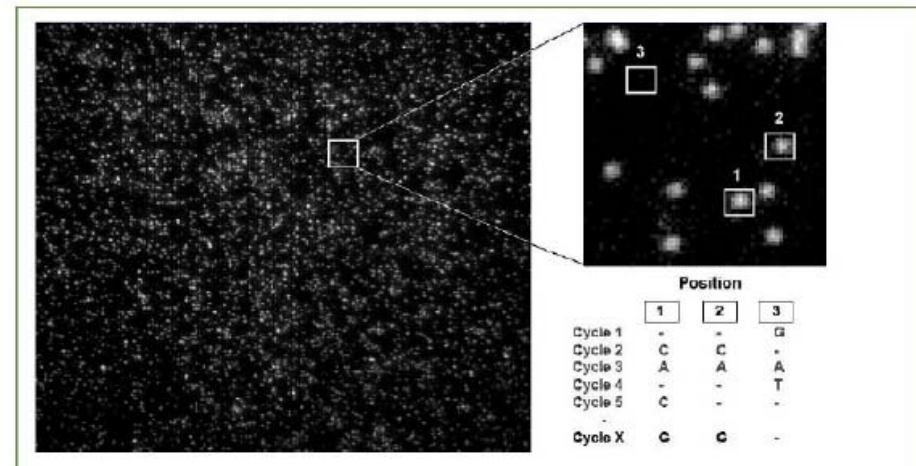
- Analýza jedné molekuly
- Potřeba malého množství vzorku
- Bez rizika kontaminace
- Analýza jakékoli NK (DNA/RNA)
- Analýza poškozených NK (archaické, muzejní, forenzní)
- Analýza DNA z nekultivovatelných organismů
- Absolutní kvantifikace

Sekvenování třetí generace - Helicos



Nucleotides flow sequentially

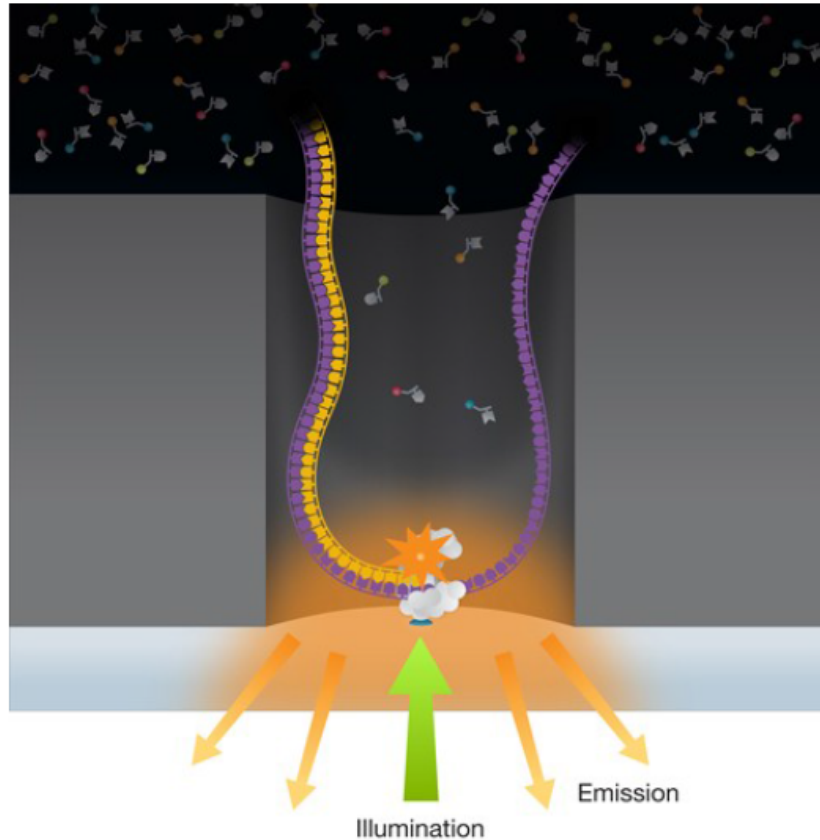
(Dark nucleotides : incorporation not detected)



Sekvenování třetí generace – PacBio RS

Pacific Biosciences

Single molecule
real-time sequencing



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

