



Středoevropský technologický institut  
BRNO | ČESKÁ REPUBLIKA

# Masivně paralelní sekvenování

**Boris Tichý**

Sdílená laboratoř Genomika

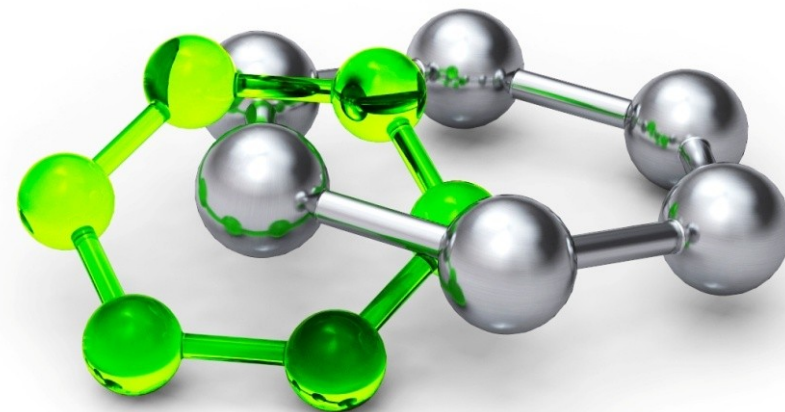
Brno, 2.10.2017



EVROPSKÁ UNIE  
EVROPSKÝ FOND PRO REGIONÁLNÍ ROZVOJ  
INVESTICE DO VAŠÍ BUDOUCNOSTI



OP Výzkum a vývoj  
pro inovace

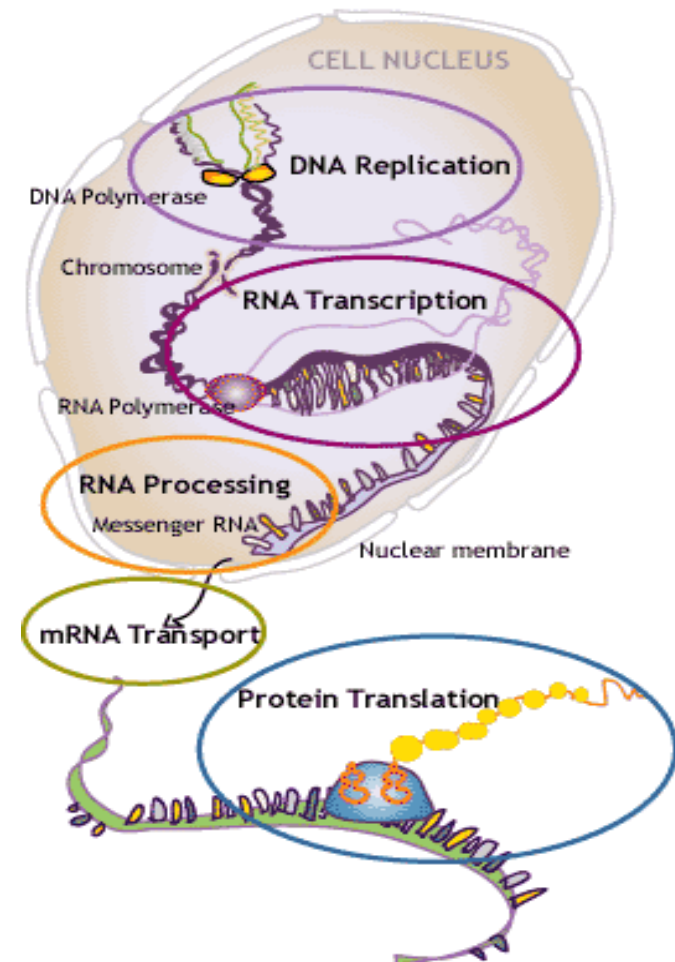
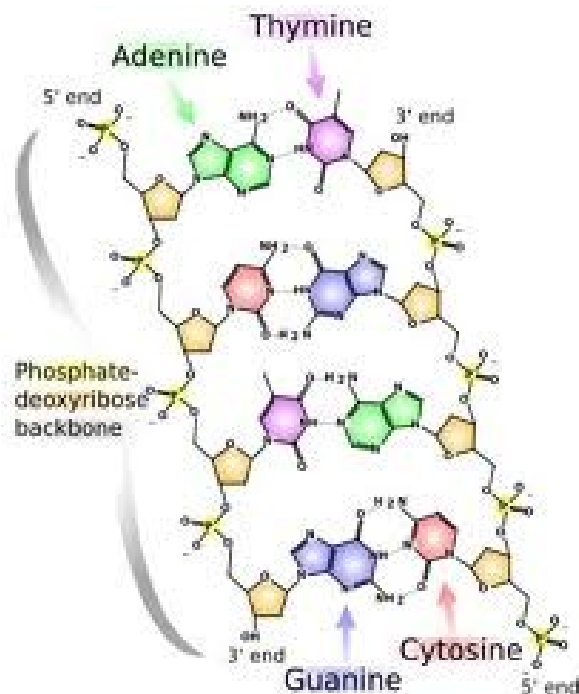


# Informace je uložena v DNA

Informace uložena jako sekvence bazí A, C, G, T

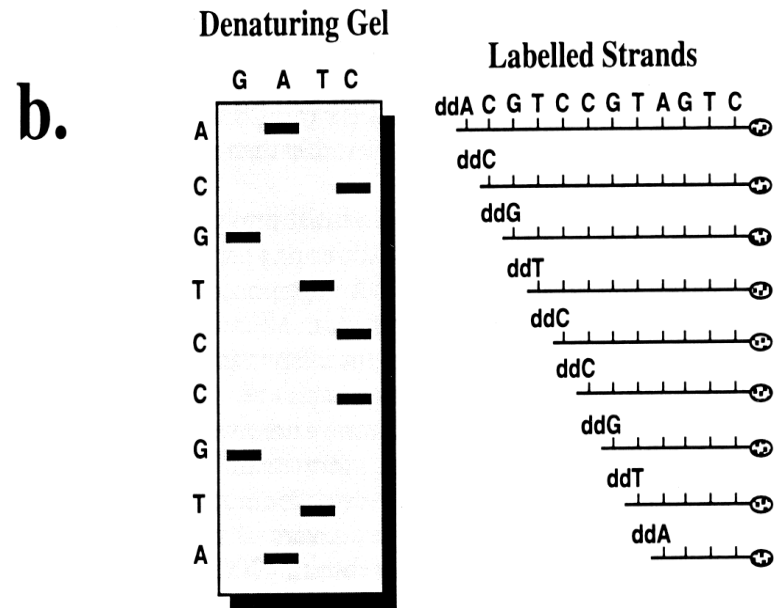
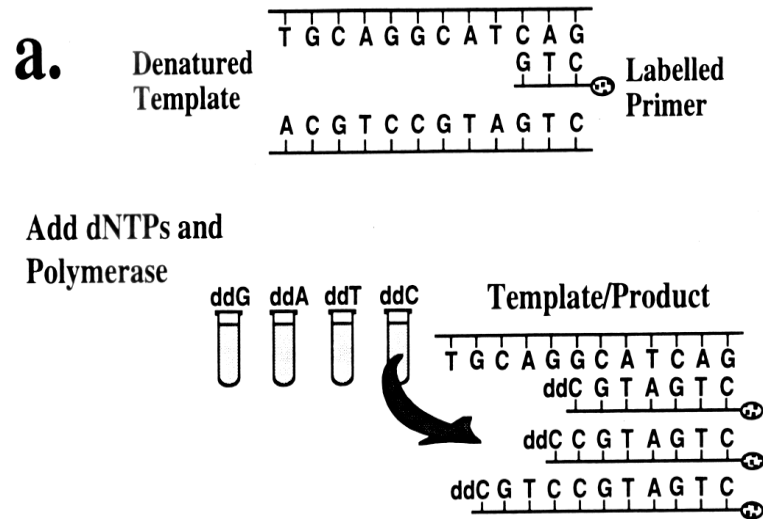
V každé lidské buňce je ~ 3 miliardy bazí = ~ 3 metry = ~ 6.6 pikogramů

Sekvence DNA je v každé buňce stejná



# Sekvenování DNA

<https://www.youtube.com/watch?v=FvHRio1yyhQ>  
<https://www.youtube.com/watch?v=e2G5zx-OJlw>

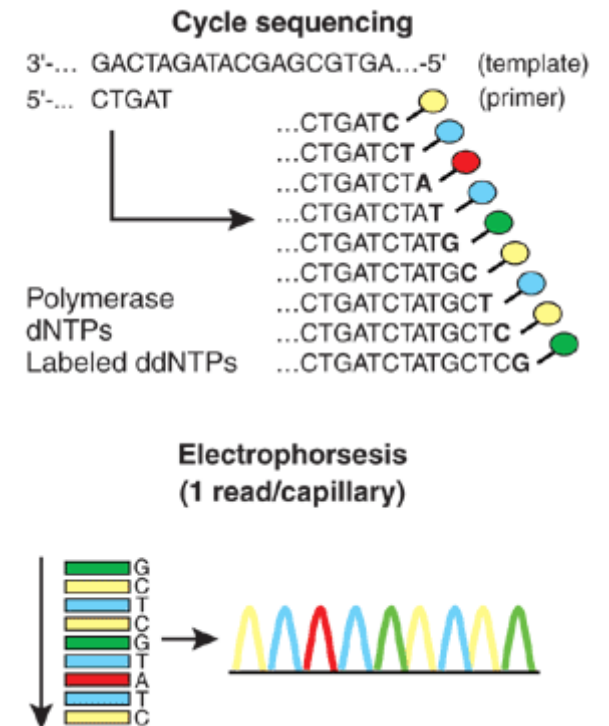


Vytvoření různě dlouhých fragmentů DNA

Dideoxy-NTPs → ukončení polymerace

Gel → kapilární elektroforéza

Značené primery nebo ddNTPs



# Masivně paralelní sekvenování

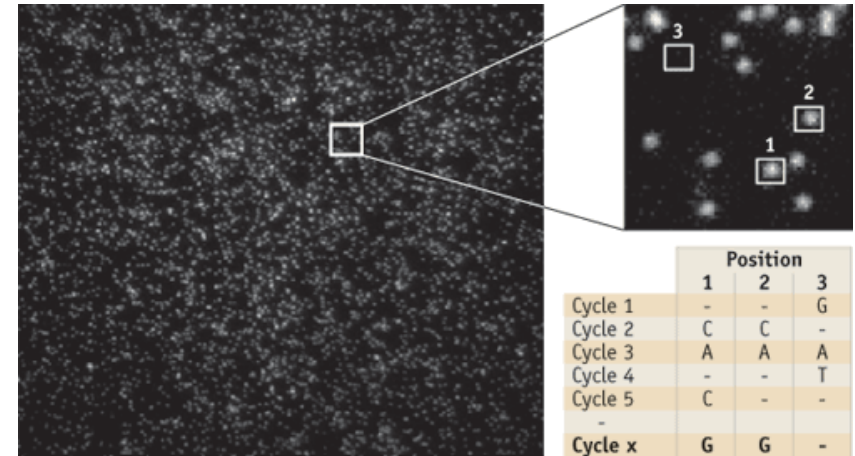
PCR amplifikace jednotlivých DNA fragmentů

nebo

Sekvenování jednotlivých DNA fragmentů

= Single molecule sequencing

Sekvence je čtena při syntéze nového řetězce



## Technologie a přístroje přizpůsobeny paralelizaci

Stovky milionů jednotlivých PCR reakcí a sekvenací najednou

(běžně prodávané kapilární sekvenátory jsou max. 96-kapilární)

Většinou kratší sekvence – desítky bazí

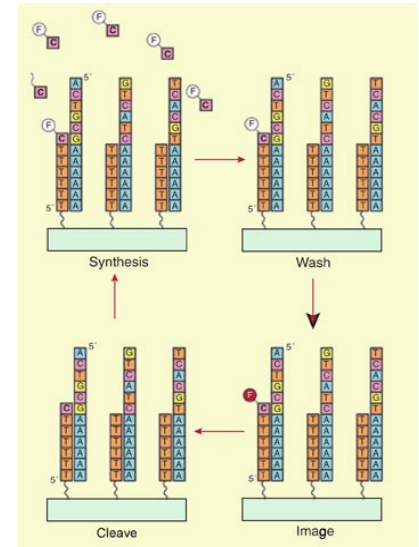
(kapilární – běžně až 1000 bazí)

# Masivně paralelní sekvenování

## Sequencing by synthesis

Polymeráza

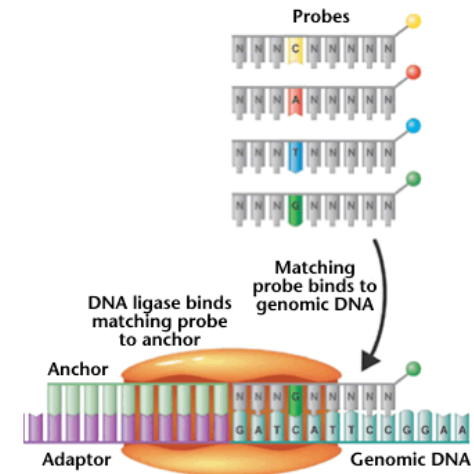
Sestavování nového řetězce z jednotlivých nukleotidů



## Sequencing by ligation

Ligáza

Sestavování nového řetězce z oligonukleotidů



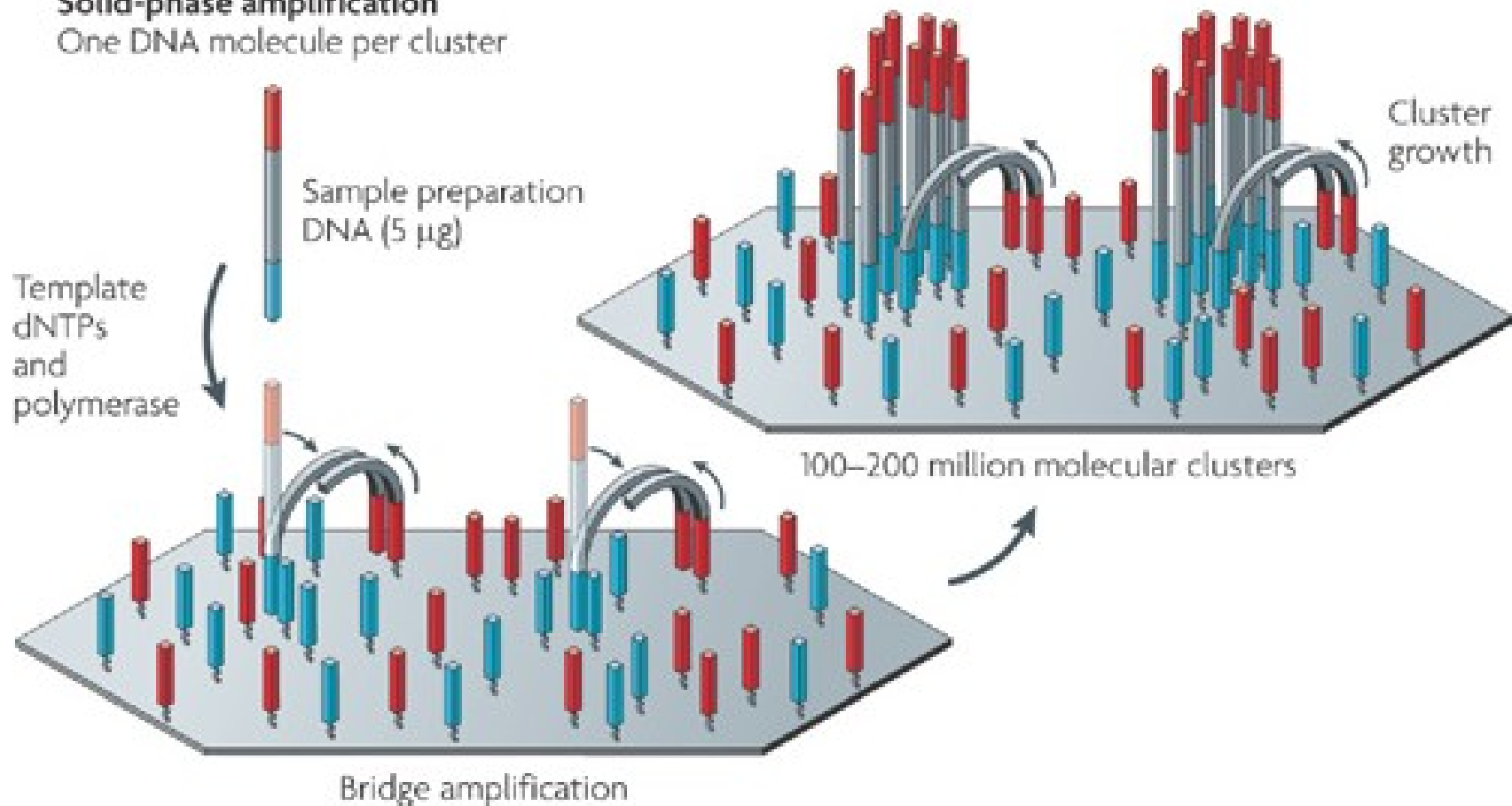
## Non-enzymatic sequencing

Nanopory, elektronová mikroskopie

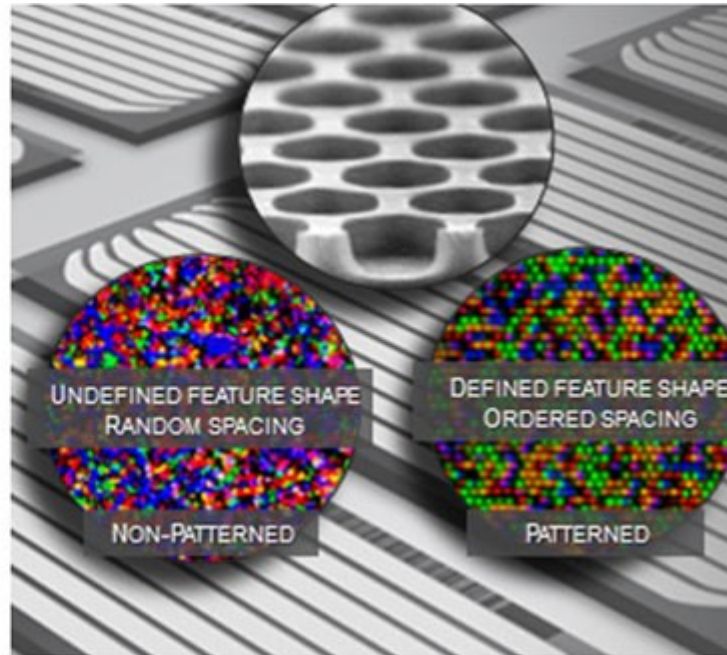
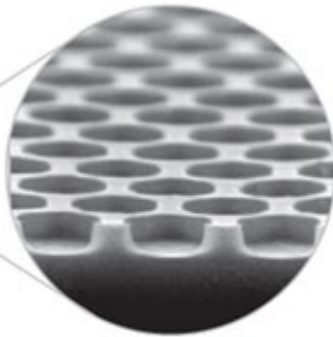
Přímé čtení sekvence

### Bridge amplifikace

**b** Illumina/Solexa  
Solid-phase amplification  
One DNA molecule per cluster



## Patterned flowcell + exclusive amplification

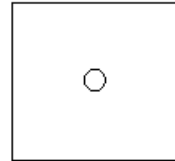
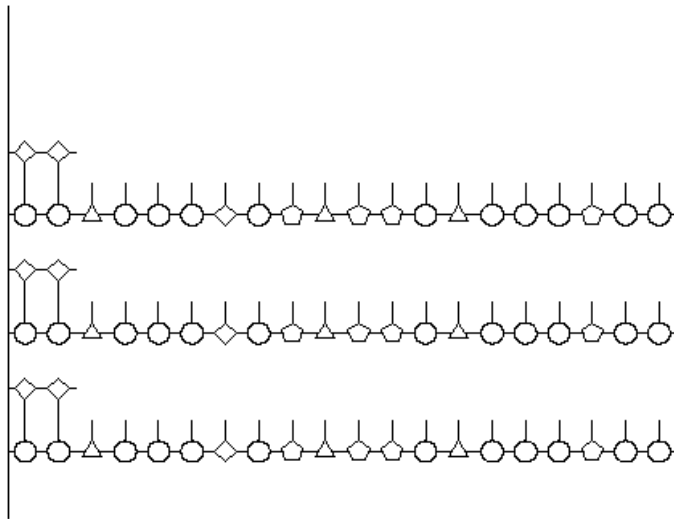


<https://www.youtube.com/watch?v=fCd6B5HRaZ8>

<https://www.youtube.com/watch?v=DJQn-qA6tTw>

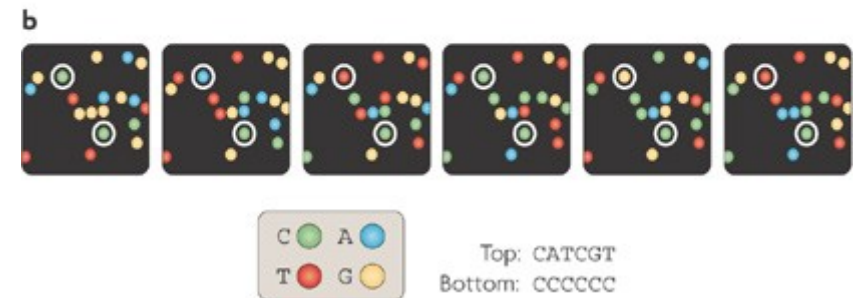
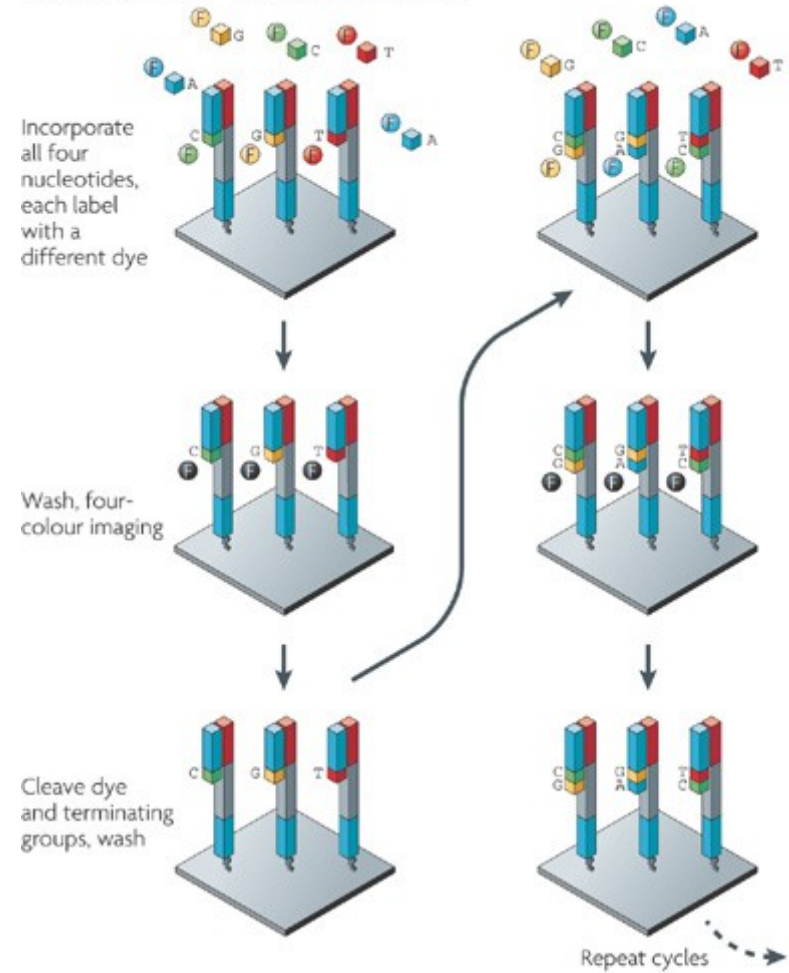
# Masivně paralelní sekvenování

## Sekvenování s reverzibilními terminátory



## Technologie Illumina

a Illumina/Solexa — Reversible terminators





### Sekvenování s reverzibilními terminátory

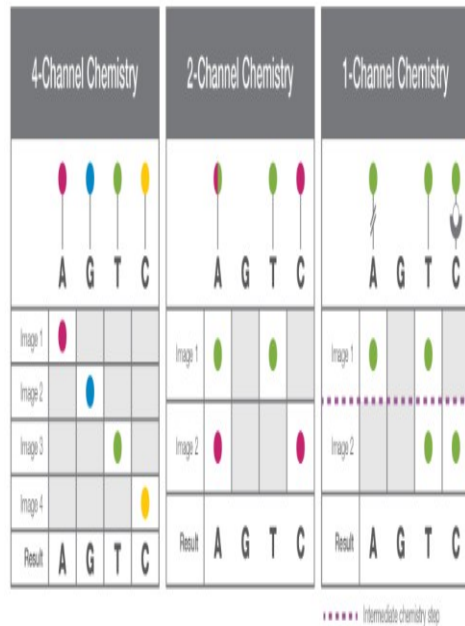
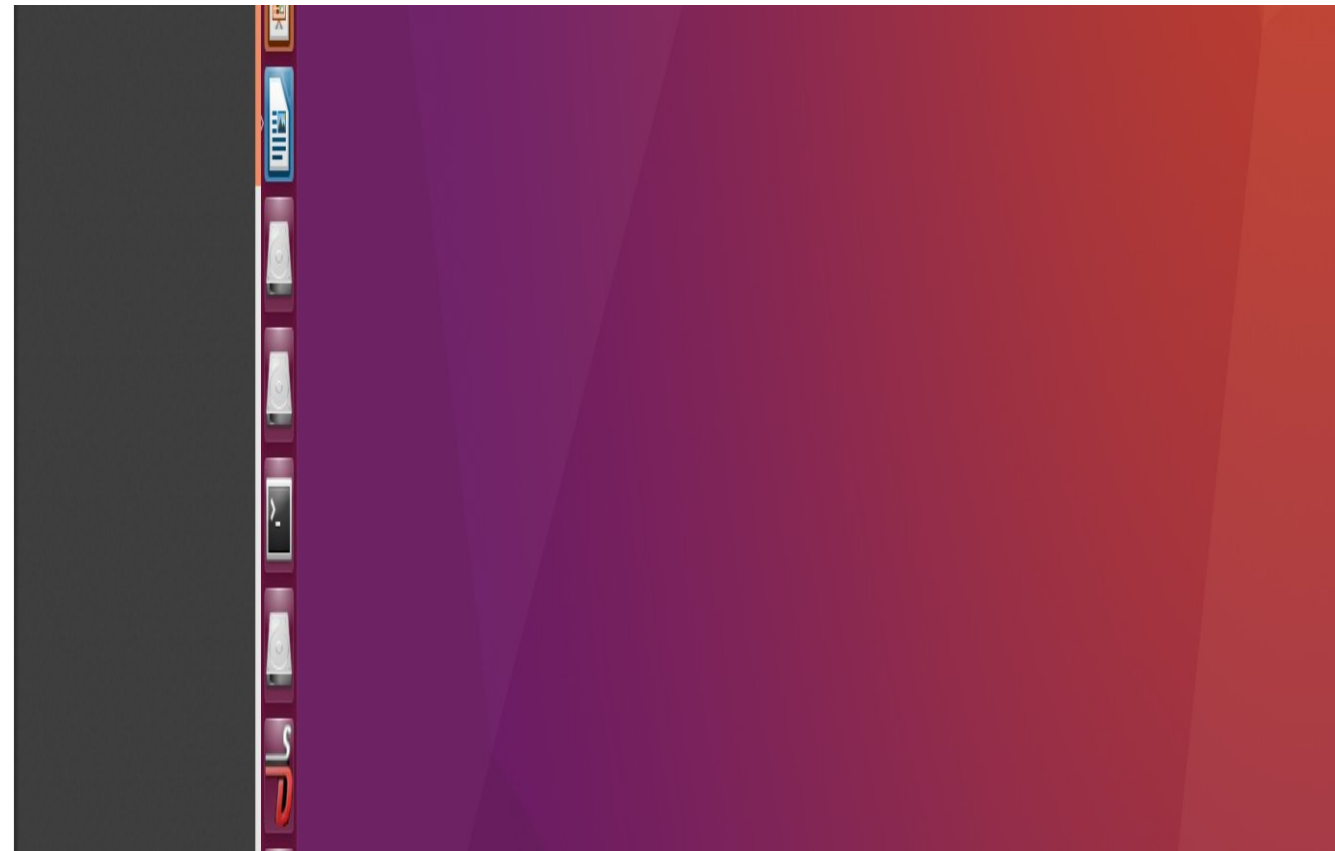


Figure 2. Four-, Two-, and One-Channel Chemistry—Four-channel chemistry uses a mixture of nucleotides labeled with four different fluorescent dyes. Two-channel chemistry uses two different fluorescent dyes, and one-channel chemistry uses only one dye. The images are processed by image analysis software to determine nucleotide identity.



# Masivně paralelní sekvenování

## Technologie Illumina



HiSeq X Ten – kapacita 18.000 genomů ročně,  
cena za genom \$1.000, cena \$10M



NovaSeq

Kapacita 16 genomů/běh,  
2TB/běh (48 genomů/6TB brzy)



HiSeq 4000

Kapacita 12  
genomů/běh  
(24/týden),  
1,5TB/běh



NextSeq 500

Kapacita 1  
genom/běh  
(3/týden),  
120GB/běh



MiSeq

Kapacita 0,15  
genomu/běh,  
15GB/běh



MiniSeq

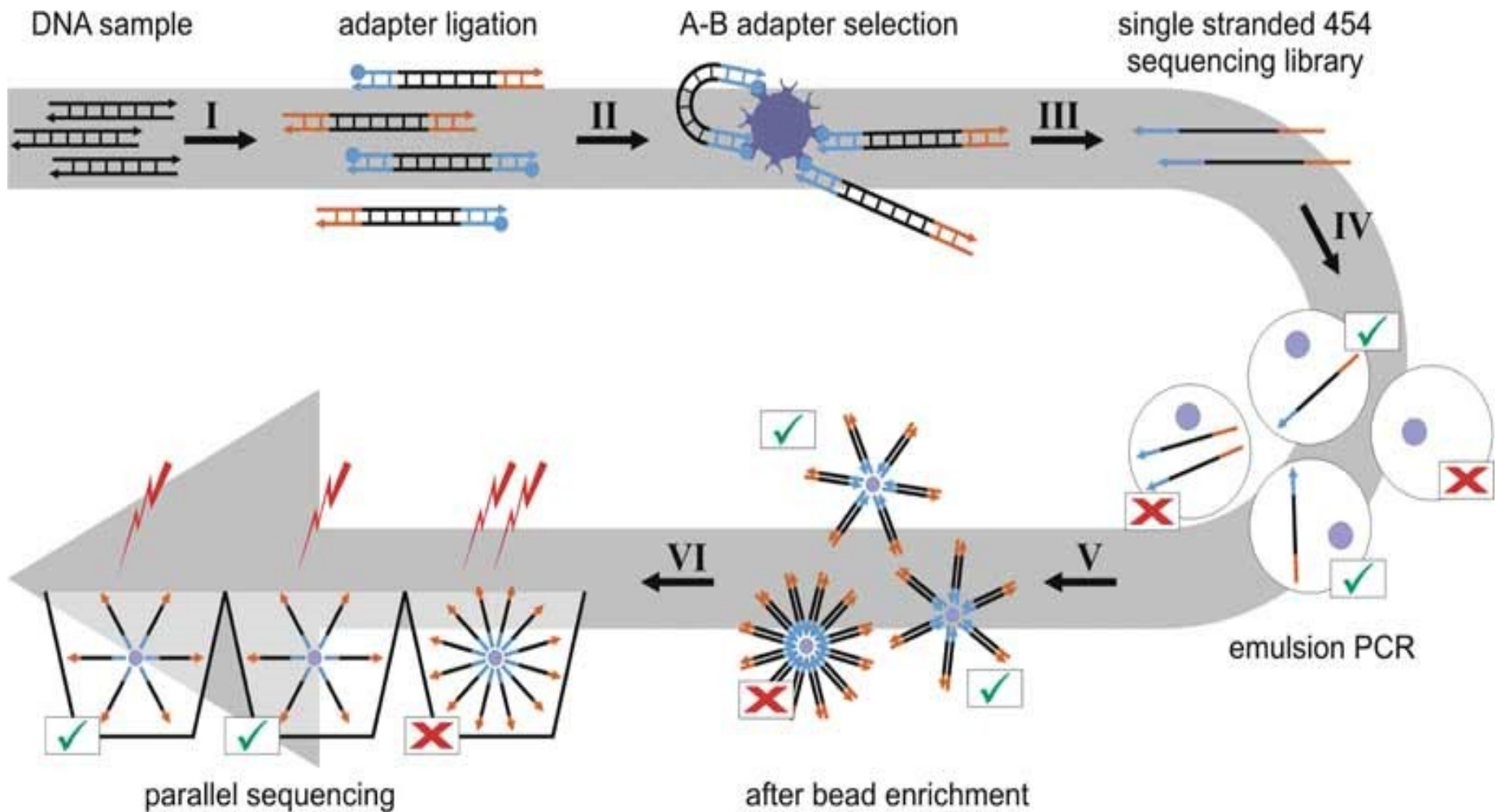
Kapacita 0,07  
genomu/běh,  
7,5GB/běh



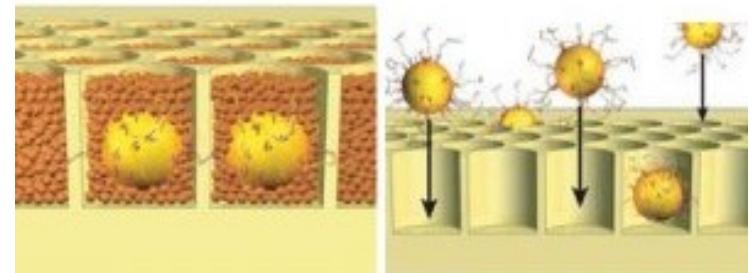
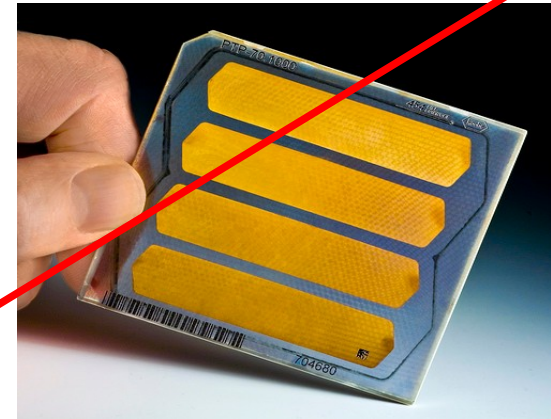
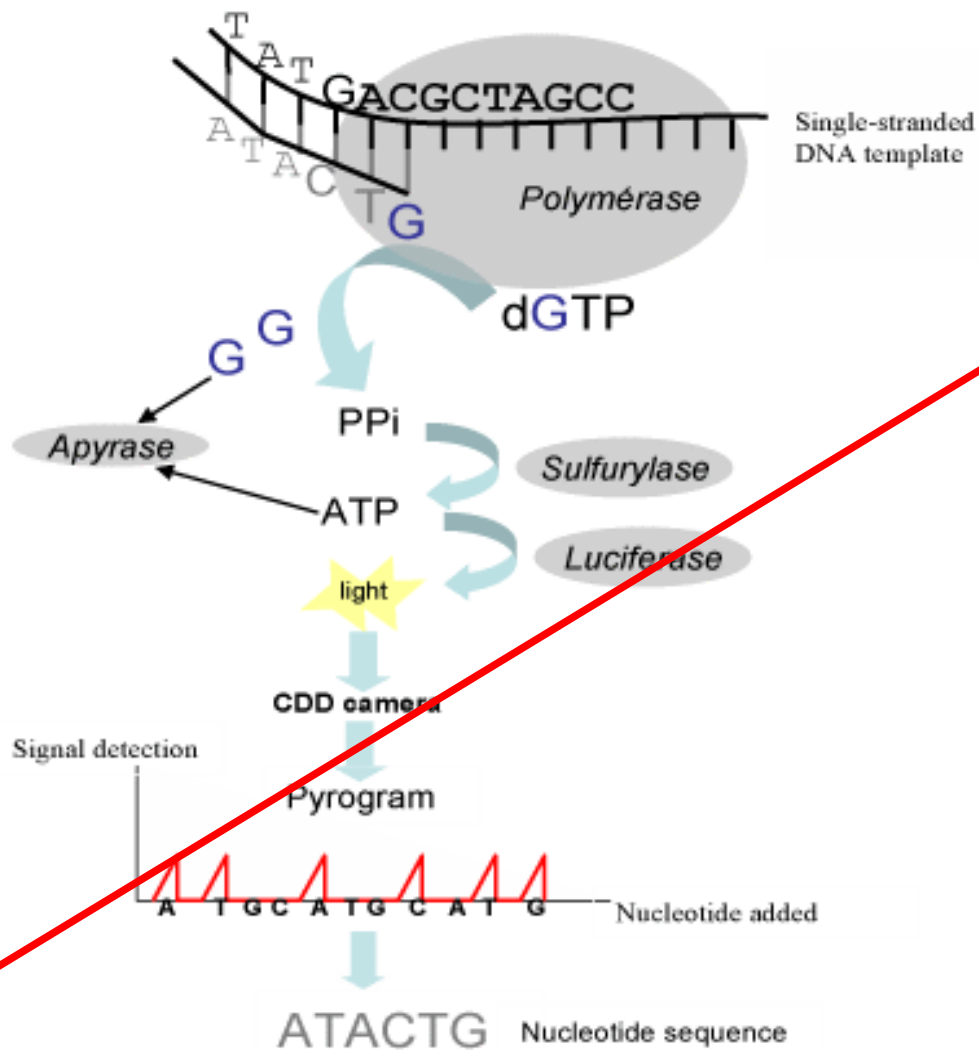
iSeq

Kapacita 0,01  
genomu/běh,  
1,2GB/běh

### Emulzní PCR

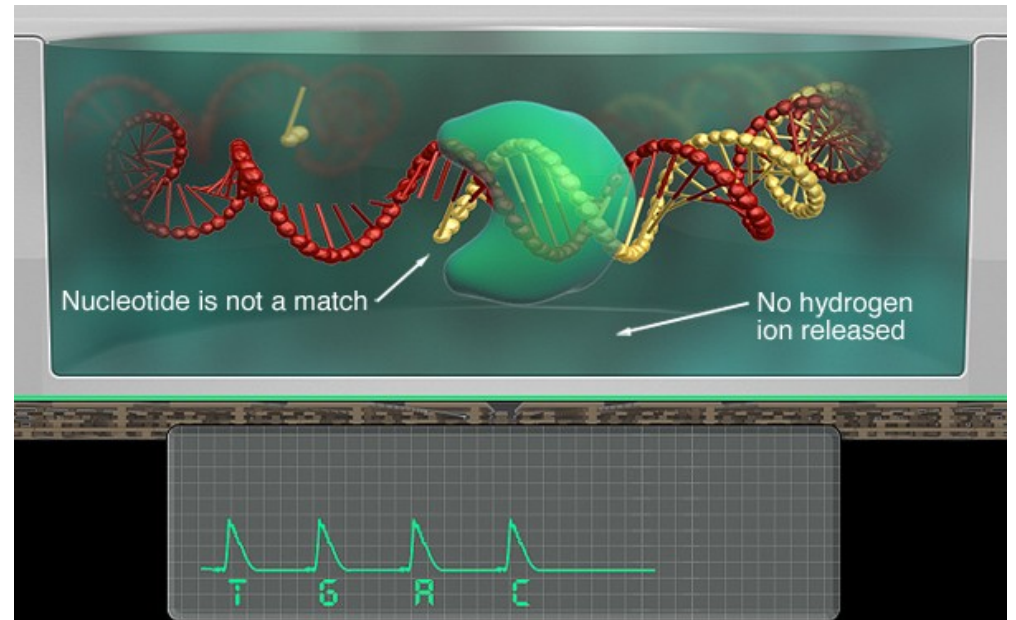
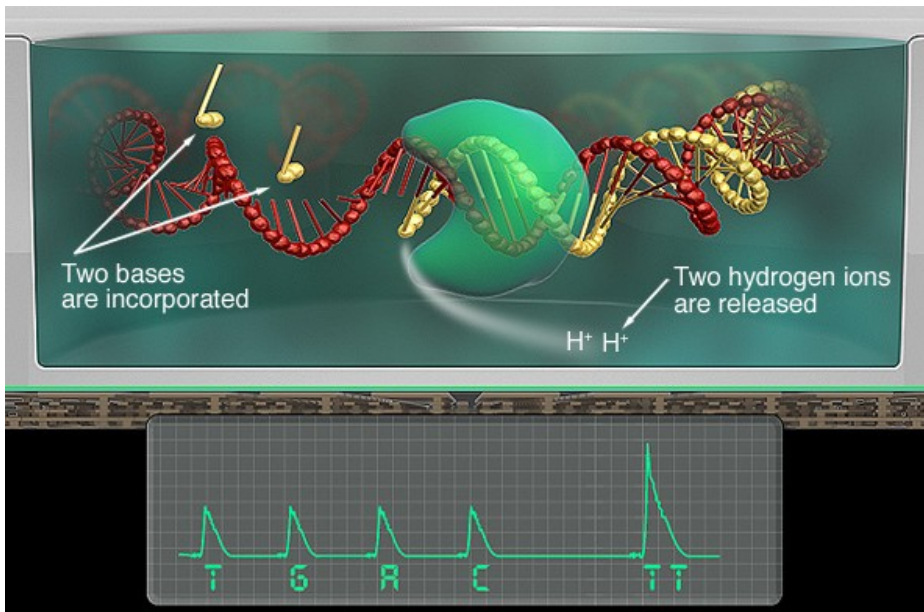
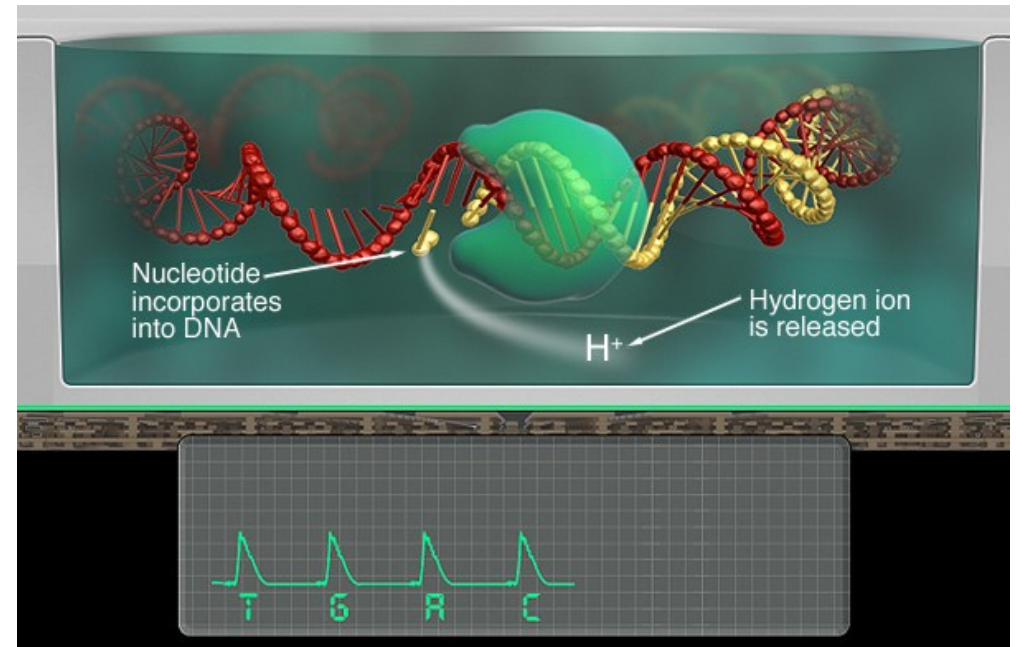
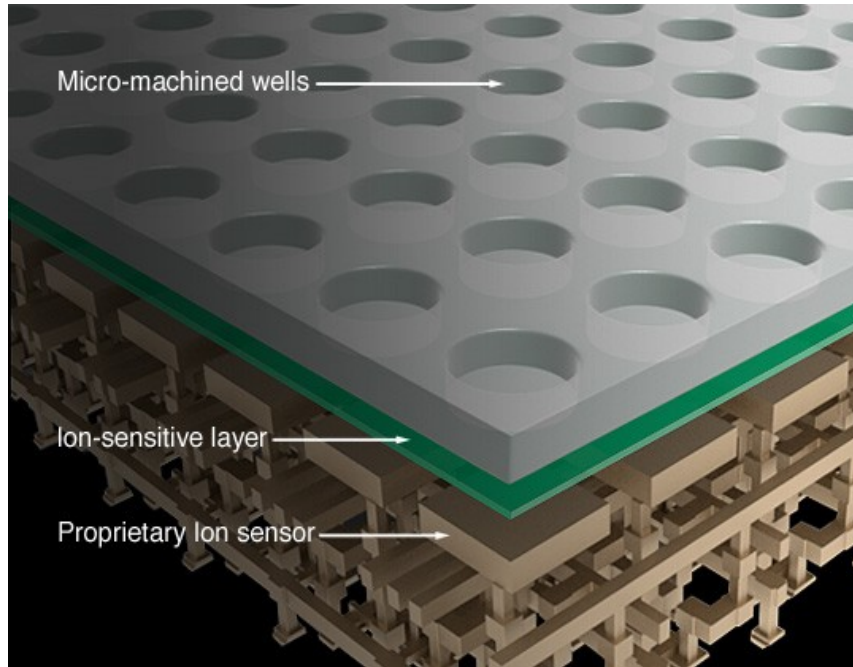


### Pyrosekvenování



# Masivně paralelní sekvenování

# Technologie Ion Torrent



# Masivně paralelní sekvenování

## Technologie Ion Torrent



Ion Torrent PGM

Kapacita 2GB/běh



Ion Proton

Kapacita 10+GB/běh



Ion S5

Kapacita 10+GB/běh

# Masivně paralelní sekvenování

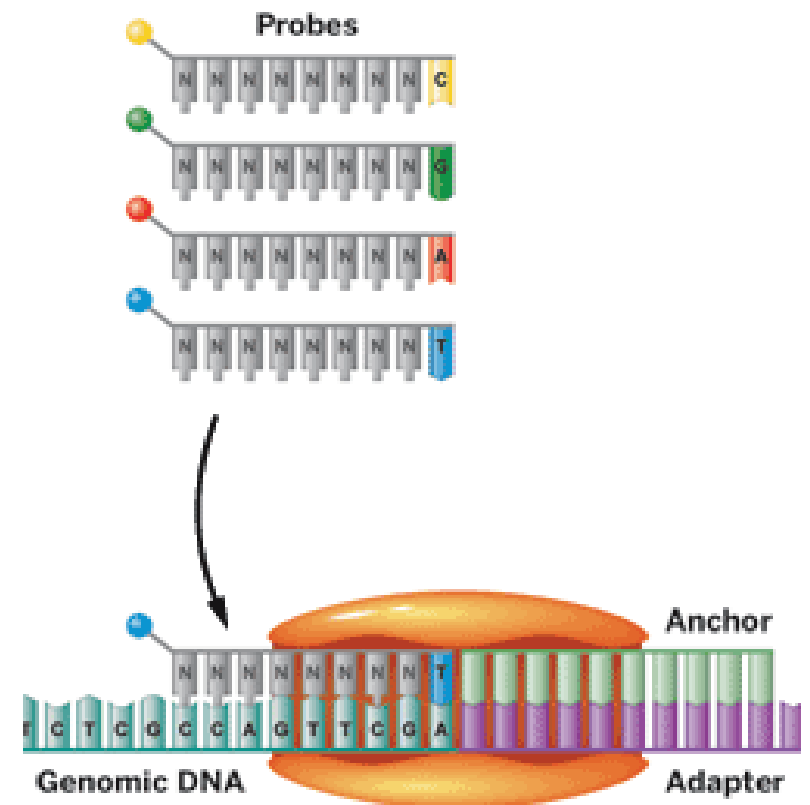
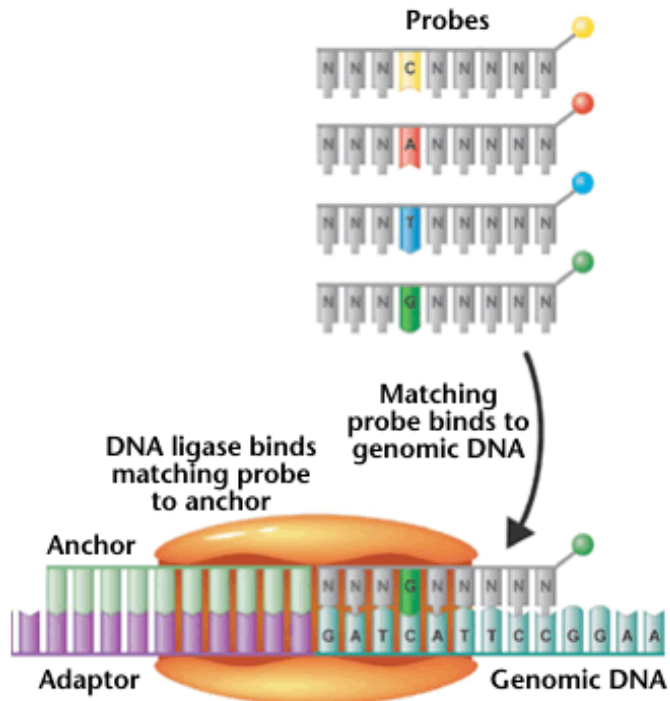
Qiagen GeneReader

Uzavřená technologie  
emPCR + SBS



# Masivně paralelní sekvenování

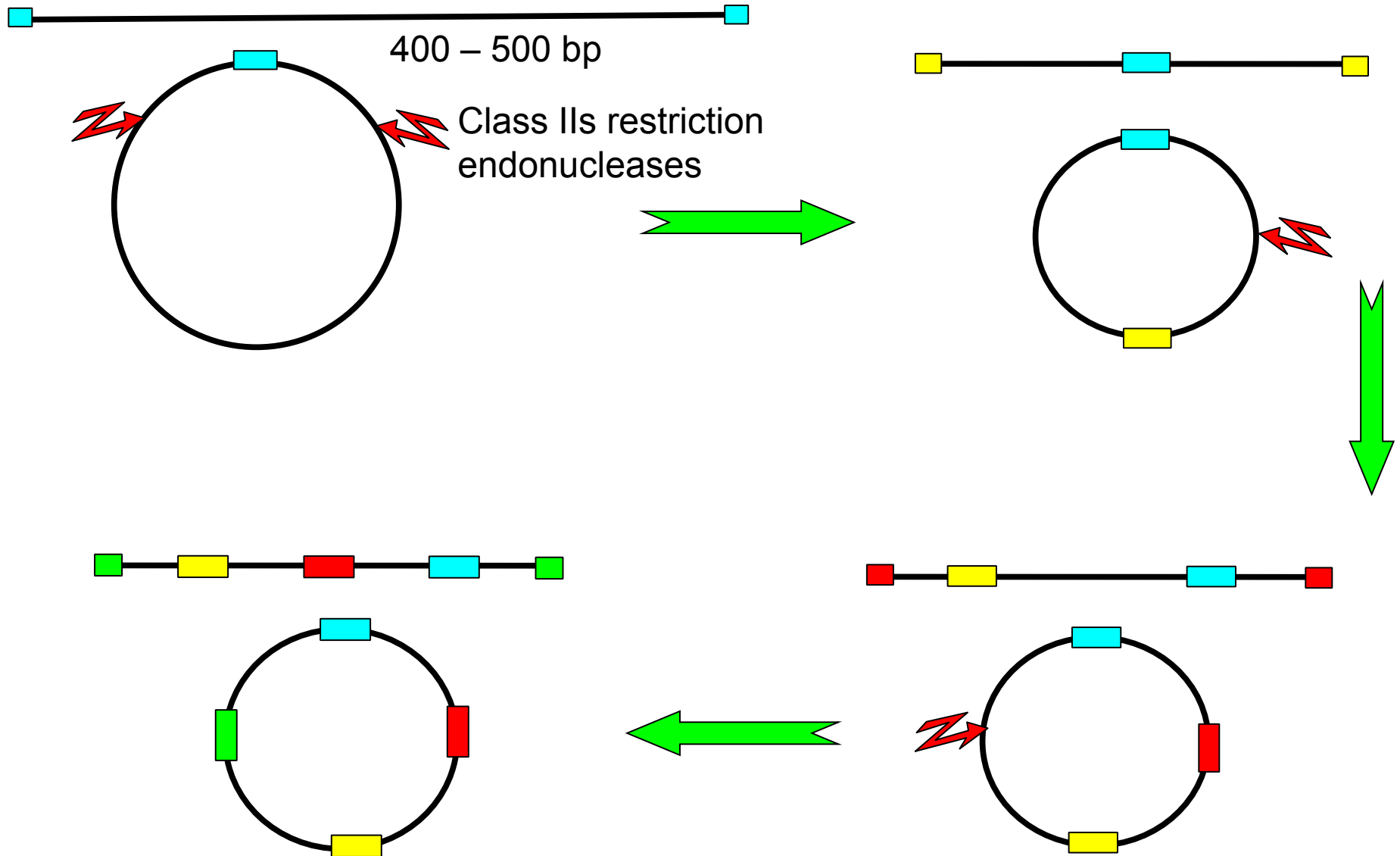
## Sekvenování (hybridizací a) ligací





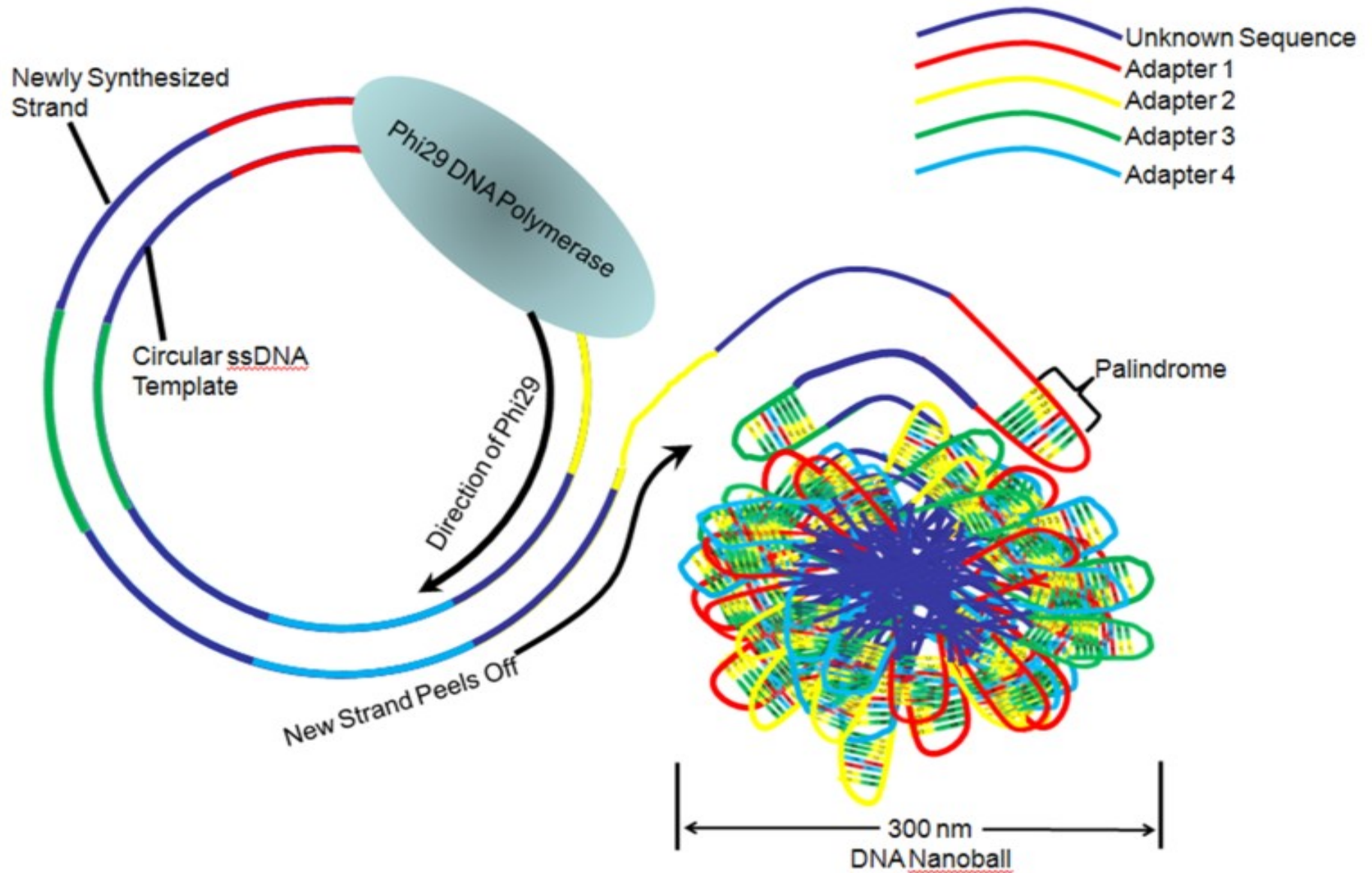
# Masivně paralelní sekvenování

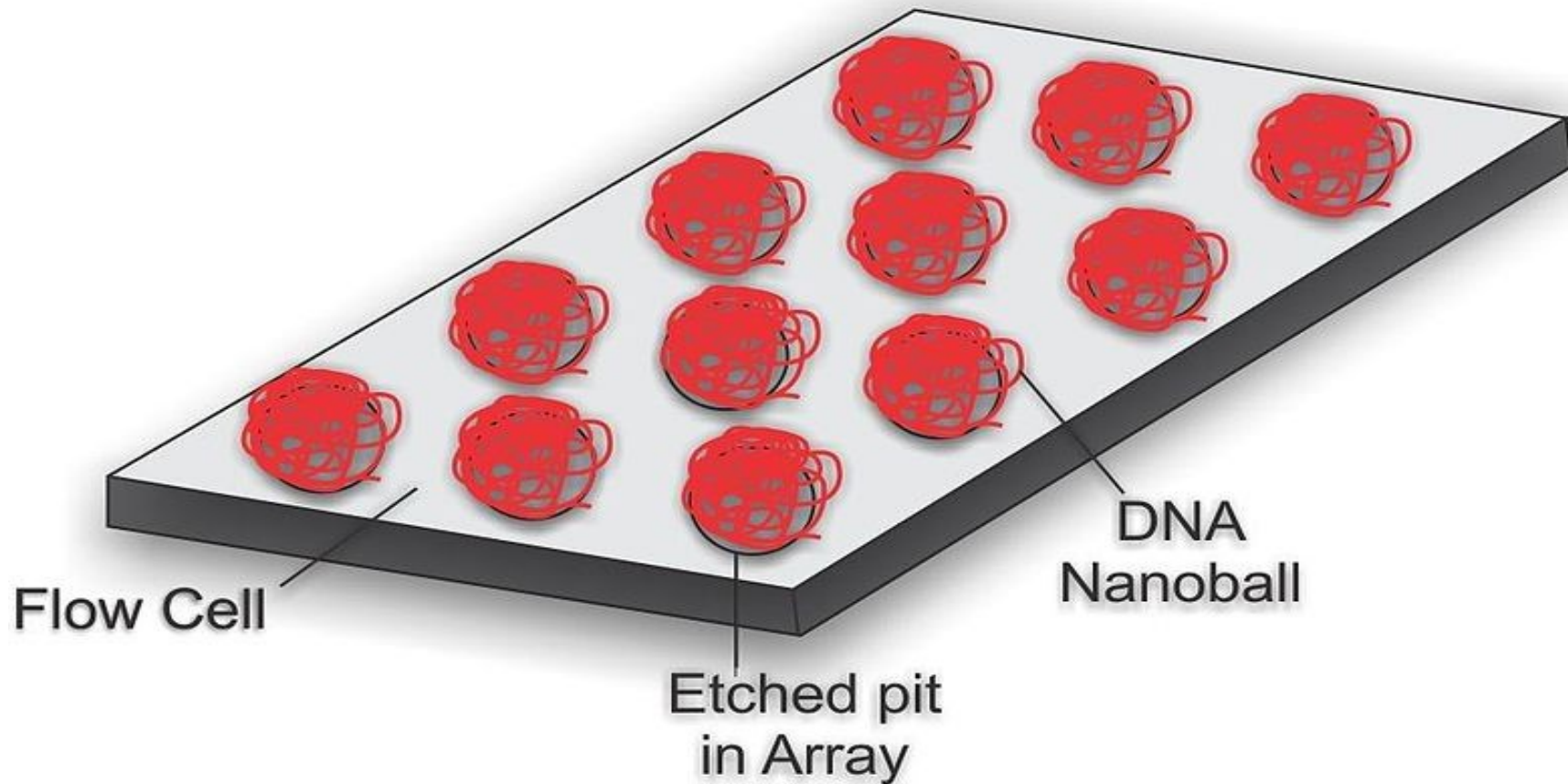
## Technologie cPAL



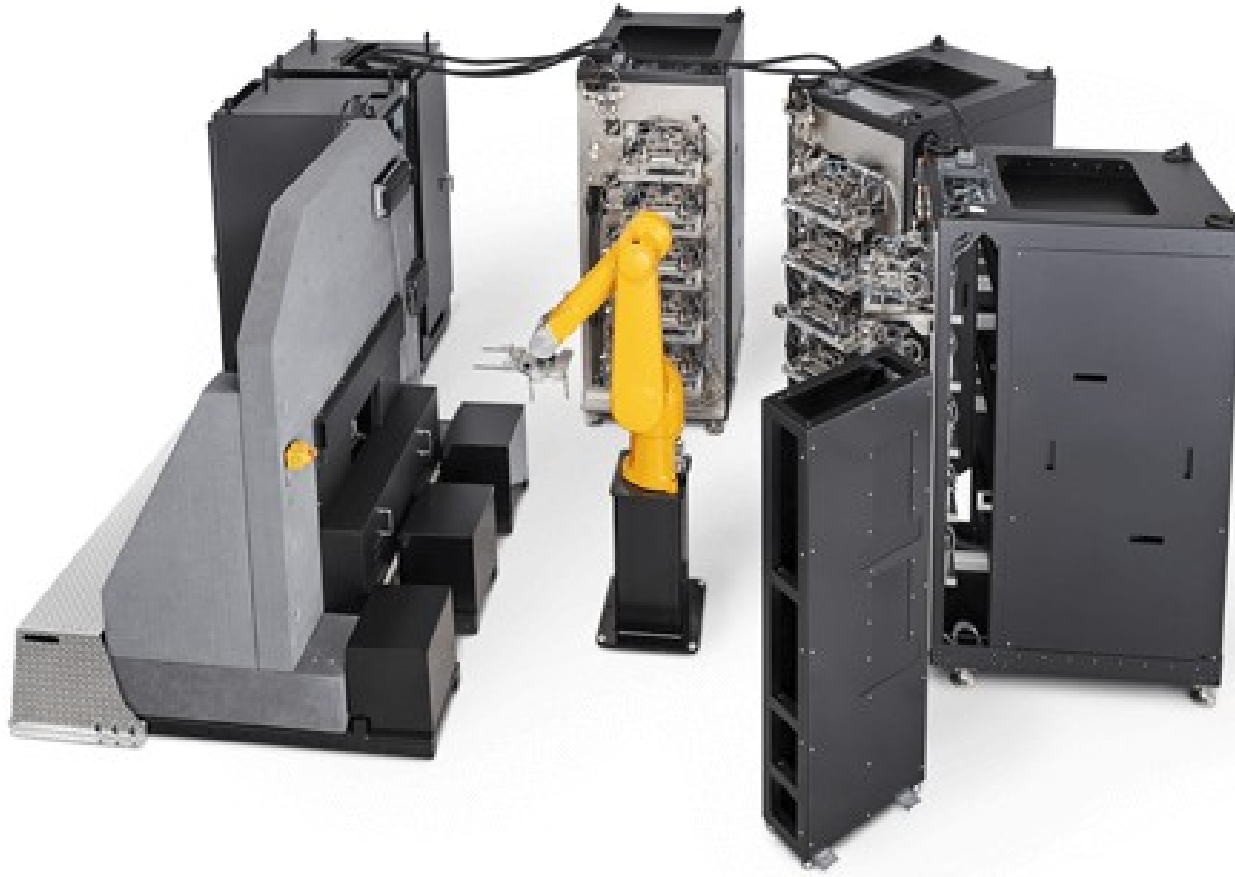
# Masivně paralelní sekvenování

## Technologie cPAL





> 2,5 miliardy jamek na ploše velikosti podložního sklíčka (rozestup 0,7 mikrometru)



Kompletní systém pro sekvenování lidských genomů a exomů

Výrobce BGI (Čína)

Kapacita 12.000 genomů/rok, cena \$ 12M

# Masivně paralelní sekvenování

Technologie cPAL



BGISEQ-500

Kapacita až 200GB



BGISEQ-50

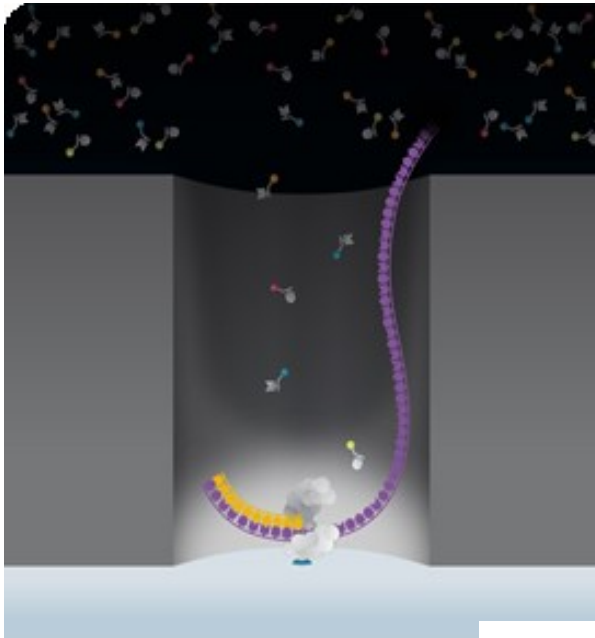
Kapacita až ?GB

<http://www.seq500.com/en/portal/videos.shtml>

# Masivně paralelní sekvenování

## Technologie SMRT

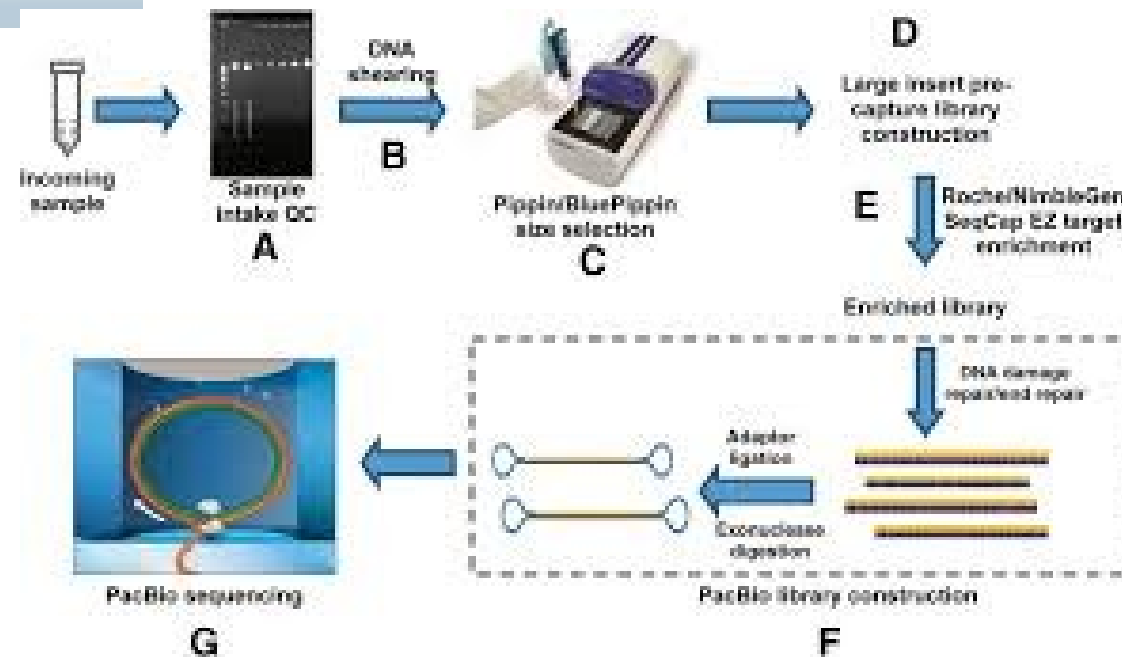
(Single Molecule Real Time)



With an active polymerase immobilized at the bottom of each ZMW, nucleotides diffuse into the ZMW chamber. In order to detect incorporation events and identify the base, each of the four nucleotides A, C, G and T are labeled with a different fluorescent color. Since only the bottom 30nm of the ZMW is illuminated, only those nucleotides near the bottom fluoresce.

<http://www.pacb.com/smrt-science>

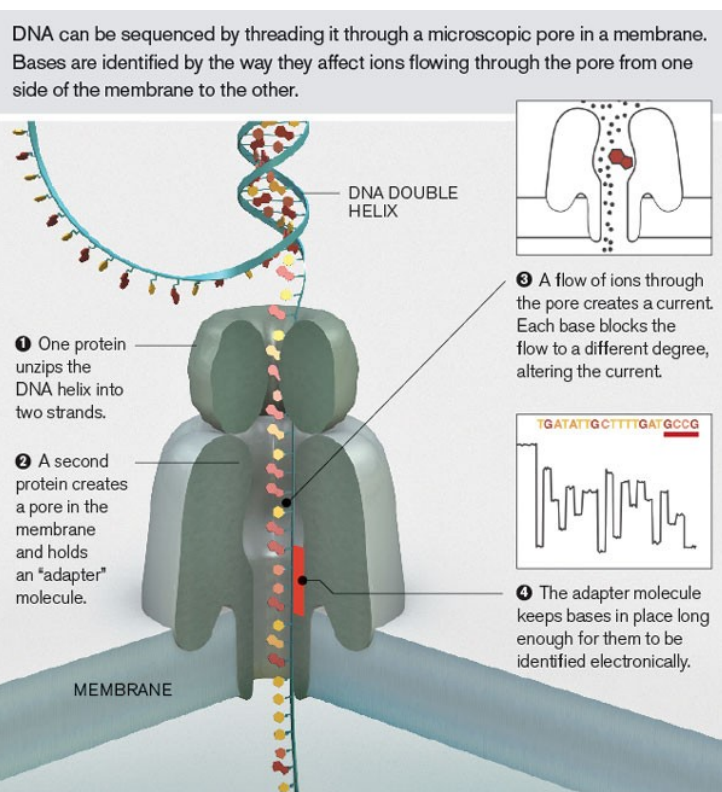
<https://www.youtube.com/watch?v=v8p4ph2MAvI>





'Strand sequencing' is a technique that passes intact DNA polymers through a protein nanopore, sequencing in real-time as the DNA translocates the pore.

SmidgION  
MinION  
GridION  
PromethION



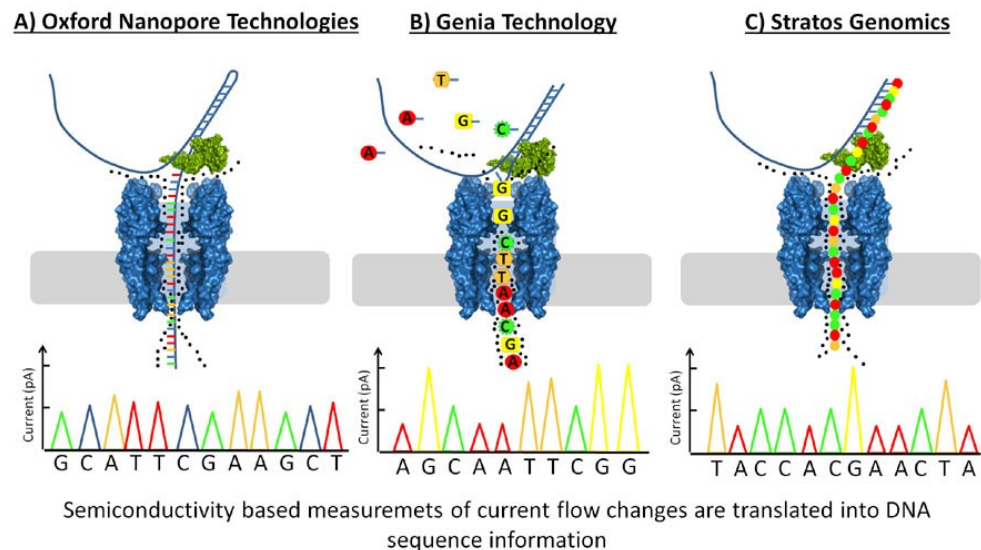
<https://www.nanoporetech.com>

<https://www.youtube.com/watch?v=hs0FdiTHMbc>

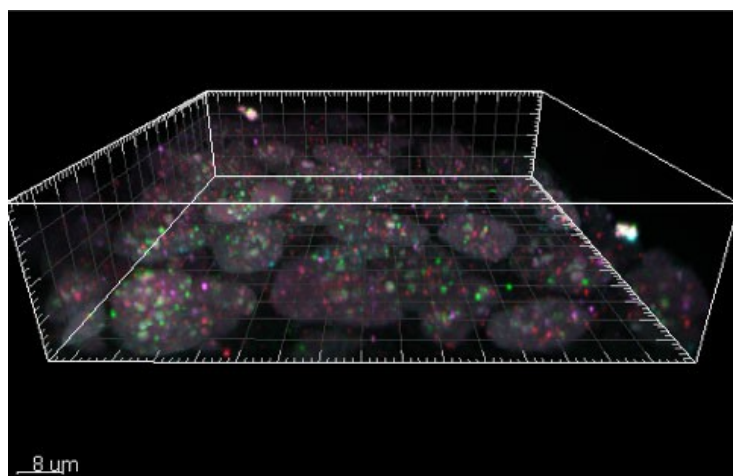
<https://www.youtube.com/watch?v=GUb1TZvMWsw>

# Masivně paralelní sekvenování

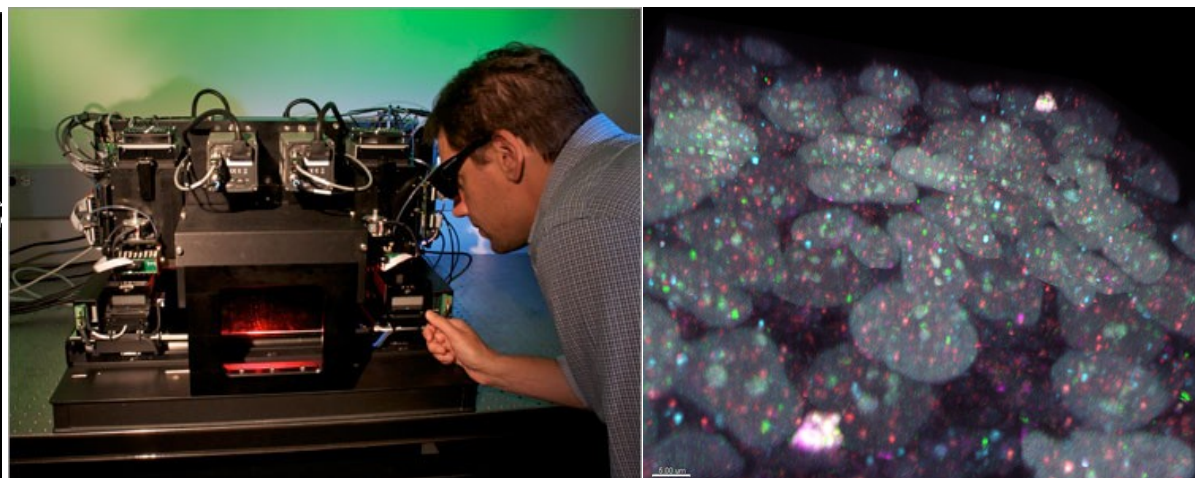
## Nanopore Sequencing Technologies



## Fluorescent In Situ Sequencing



## ReadCooor





# Kontrola kvality vzorku

## Metody

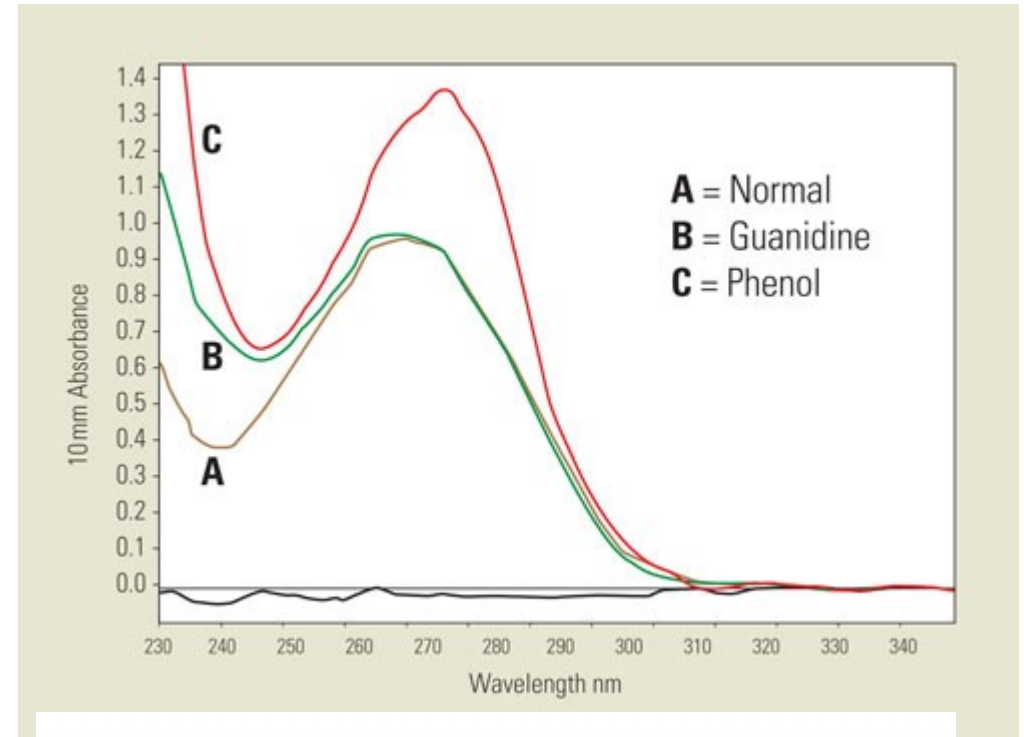
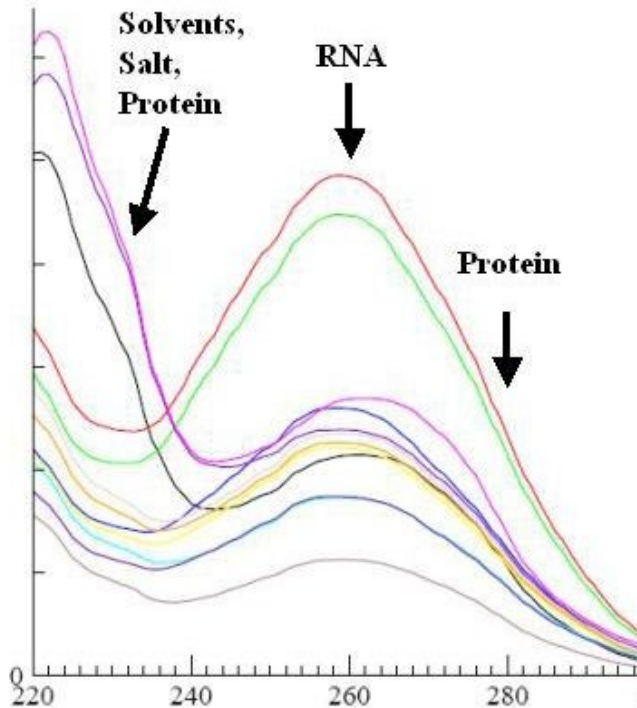
Spektrofotometrie  
Fluorimetrie  
Elektroforéza  
PCR/qPCR

## Problematické vzorky

FFPE – fragmentace, modifikace  
Rostliny – kontaminace  
Tkáně – fragmentace  
...

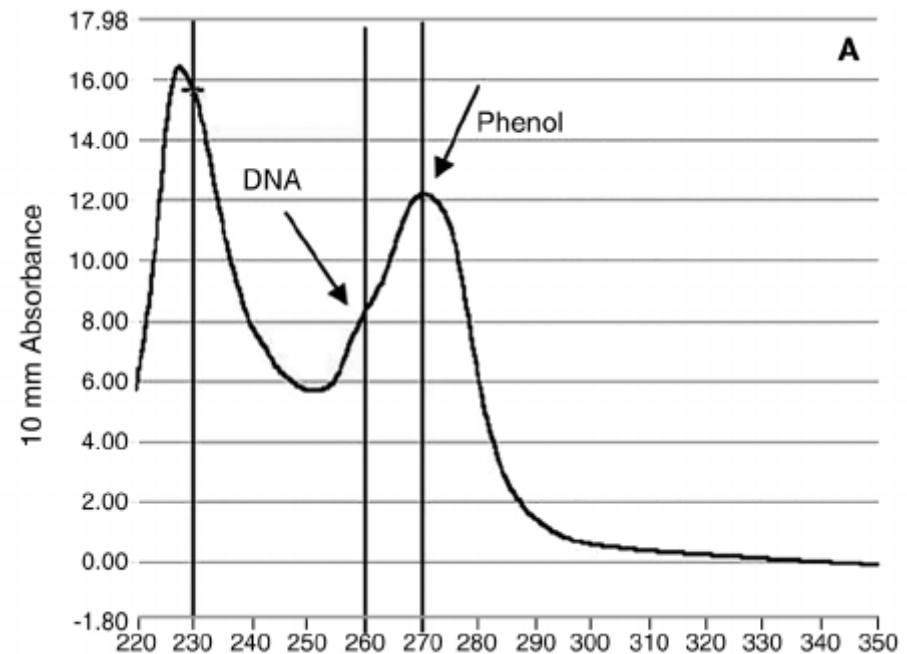
# Kontrola kvality vzorku

## Spektrofotometrie



NanoDrop  
Trinean DropSense  
Substrakce kontaminant

...



# Kontrola kvality vzorku

## Fluorimetrie

Fluorescenční barviva  
Aktivace vazbou s DNA/RNA  
PicoGreen  
RiboGreen  
OliGreen

Kvantifikace neovlivněná kontaminanty  
Selektivní kvantifikace dsDNA, ssDNA, RNA



Qubit

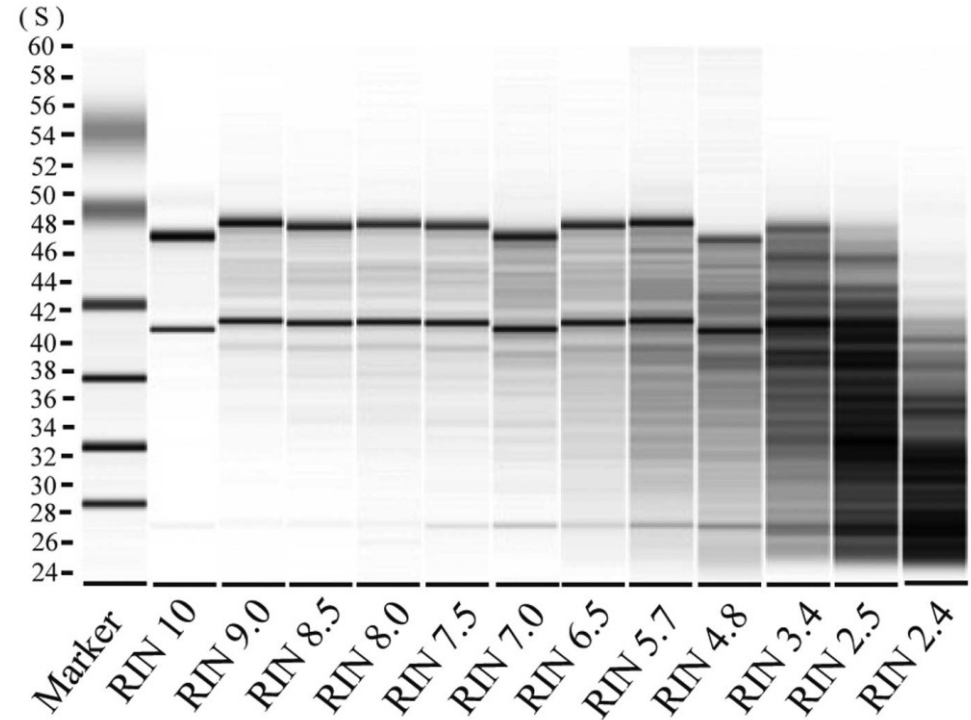
# Kontrola kvality vzorku

## Elektroforéza

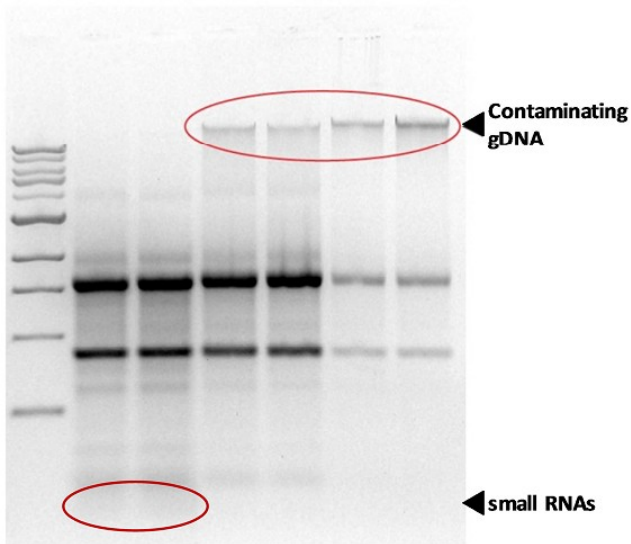
Integrita (fragmentace)  
Kontaminace  
Koncentrace

Agarosový gel  
Fragment Analyzer  
BioAnalyzer  
TapeStation

...

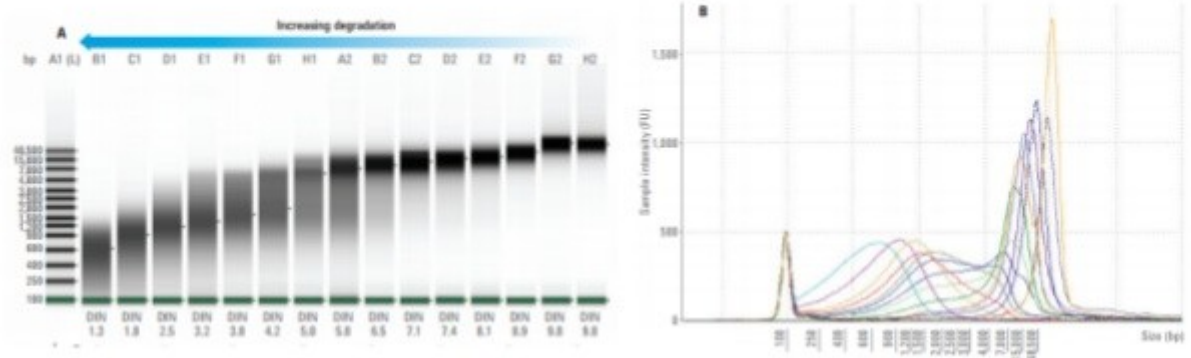


Zymo Research    Supplier Q    Supplier P



## FFPE QC methods—TapeStation® Instrument (Agilent)

### DNA Integrity Number (DIN)

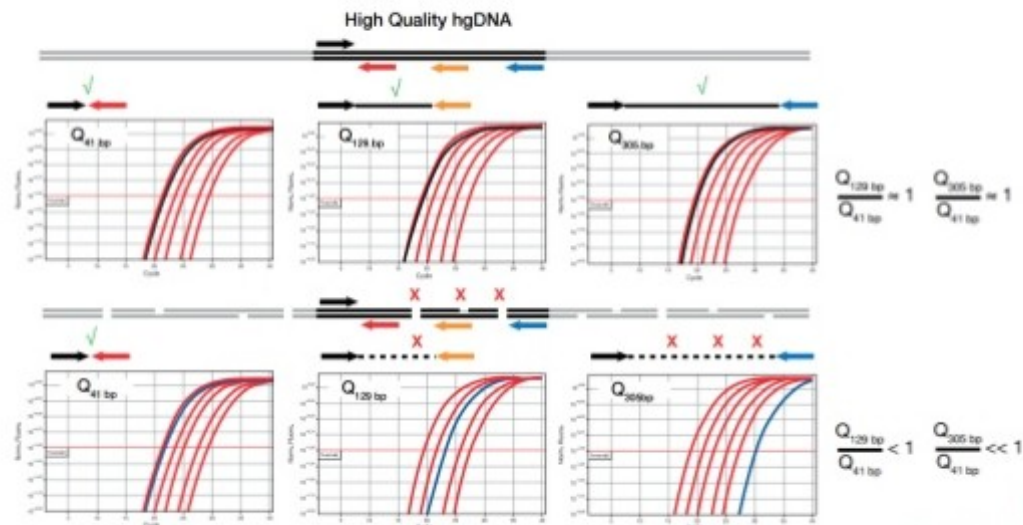


# Kontrola kvality vzorku

## PCR/qPCR

Kontrola integrity  
PCR produkty různých délek  
Kvantifikace  
Detekce PCR inhibitorů

### FFPE QC methods—hgDNA Quantification and QC Kit (KAPA)



[https://www.kapabiosystems.com/assets/KAPA\\_hgDNA\\_Quantification\\_and\\_QC\\_Kit\\_TDS.pdf](https://www.kapabiosystems.com/assets/KAPA_hgDNA_Quantification_and_QC_Kit_TDS.pdf)



# Děkuji za pozornost

Středoevropský technologický institut  
c/o Masarykova univerzita  
Žerotínovo nám. 9  
601 77 Brno, Česká republika

[www.ceitec.cz](http://www.ceitec.cz) | [info@ceitec.cz](mailto:info@ceitec.cz)



EVROPSKÁ UNIE  
EVROPSKÝ FOND PRO REGIONÁLNÍ ROZVOJ  
INVESTICE DO VAŠÍ BUDOUCNOSTI



OP Výzkum a vývoj  
pro inovace

