



Středoevropský technologický institut
BRNO | ČESKÁ REPUBLIKA

Masivně paralelní sekvenování

Boris Tichý

Sdílená laboratoř Genomika

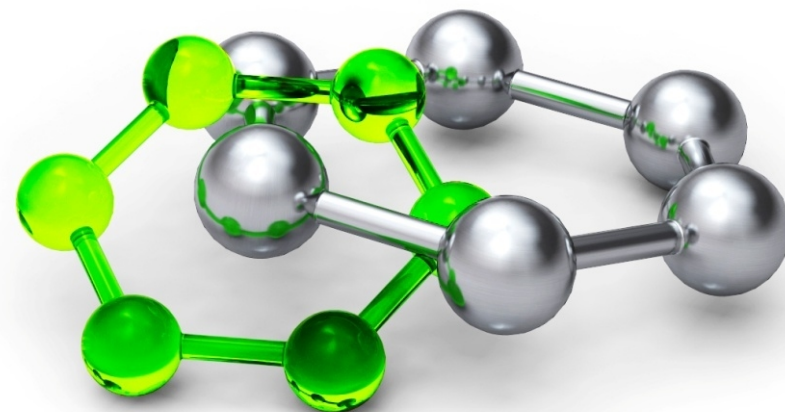
Brno, 21.10.2019



EVROPSKÁ UNIE
EVROPSKÝ FOND PRO REGIONÁLNÍ ROZVOJ
INVESTICE DO VAŠÍ BUDOUCNOSTI



OP Výzkum a vývoj
pro inovace

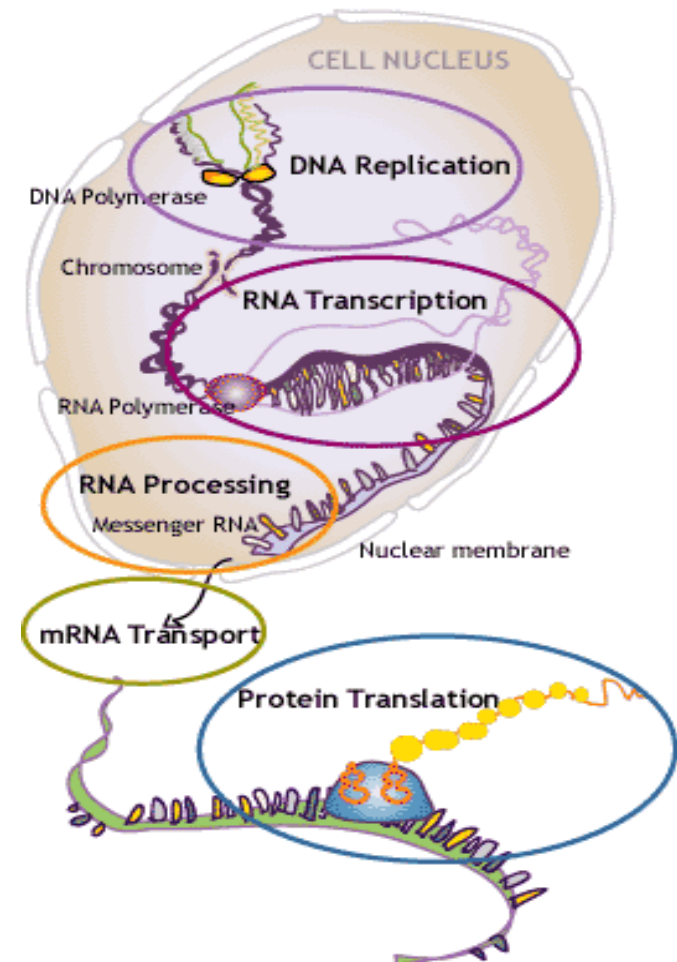
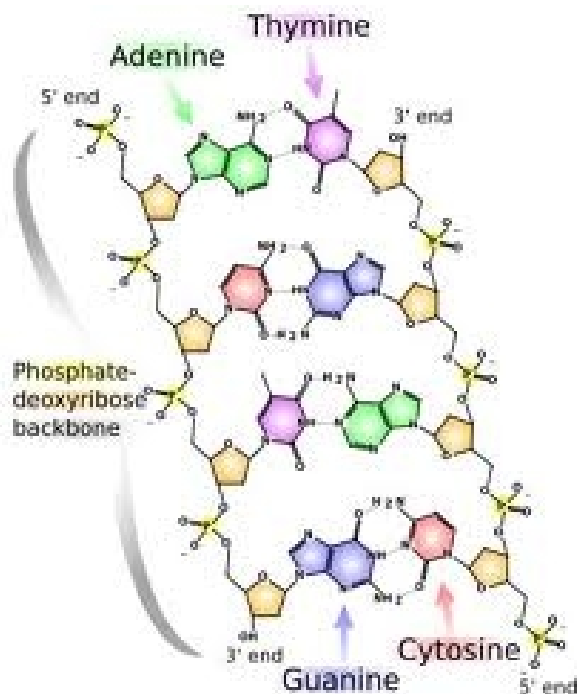


Informace je uložena v DNA

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

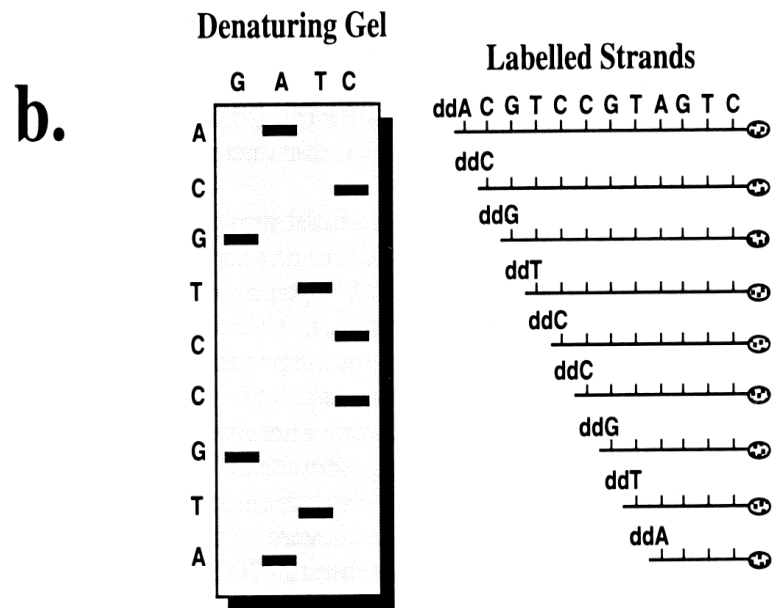
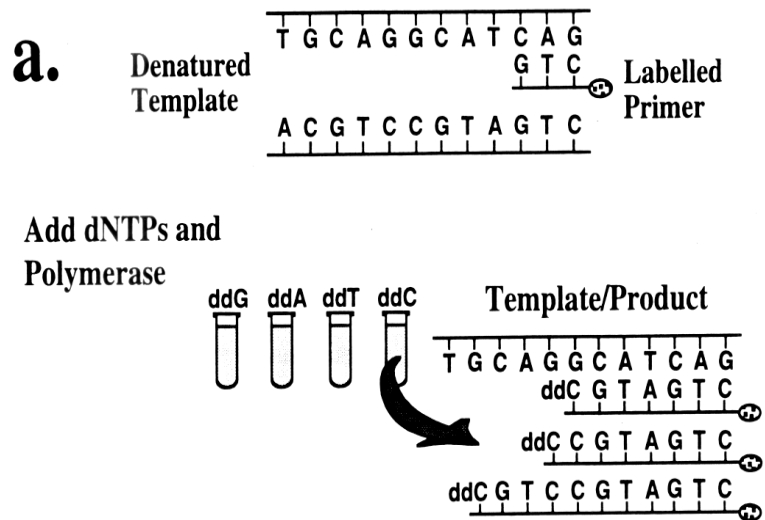
V každé lidské buňce je ~ 3 miliardy bazí = ~ 3 metry = ~ 6.6 pikogramů

Sekvence DNA je v každé buňce stejná



Sekvenování DNA

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

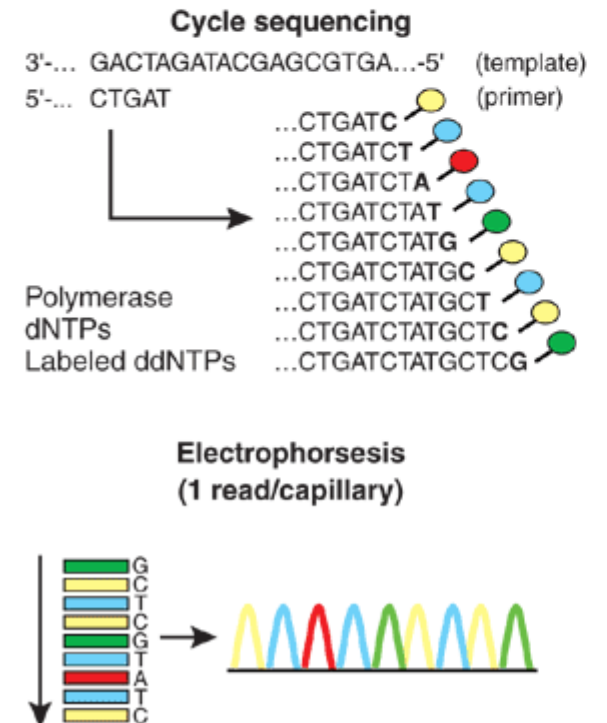


Vytvoření různě dlouhých fragmentů DNA

Dideoxy-NTPs → ukončení polymerace

Gel → kapilární elektroforéza

Značené primery nebo ddNTPs



Masivně paralelní sekvenování

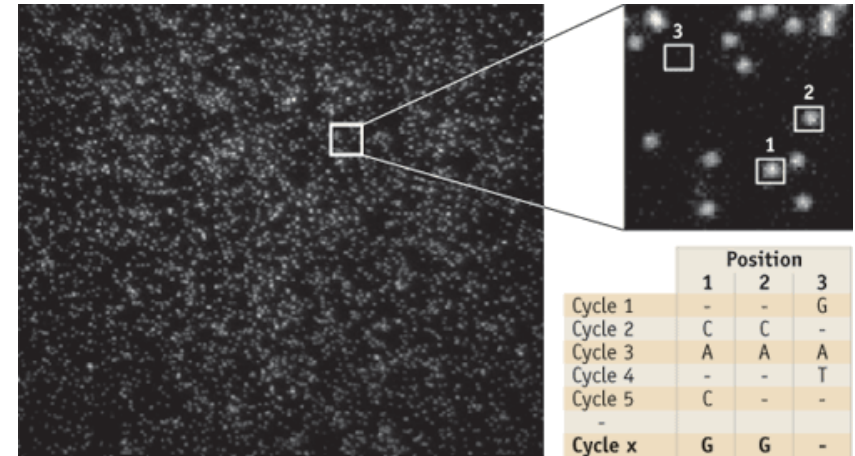
PCR amplifikace jednotlivých DNA fragmentů a sekvenování

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

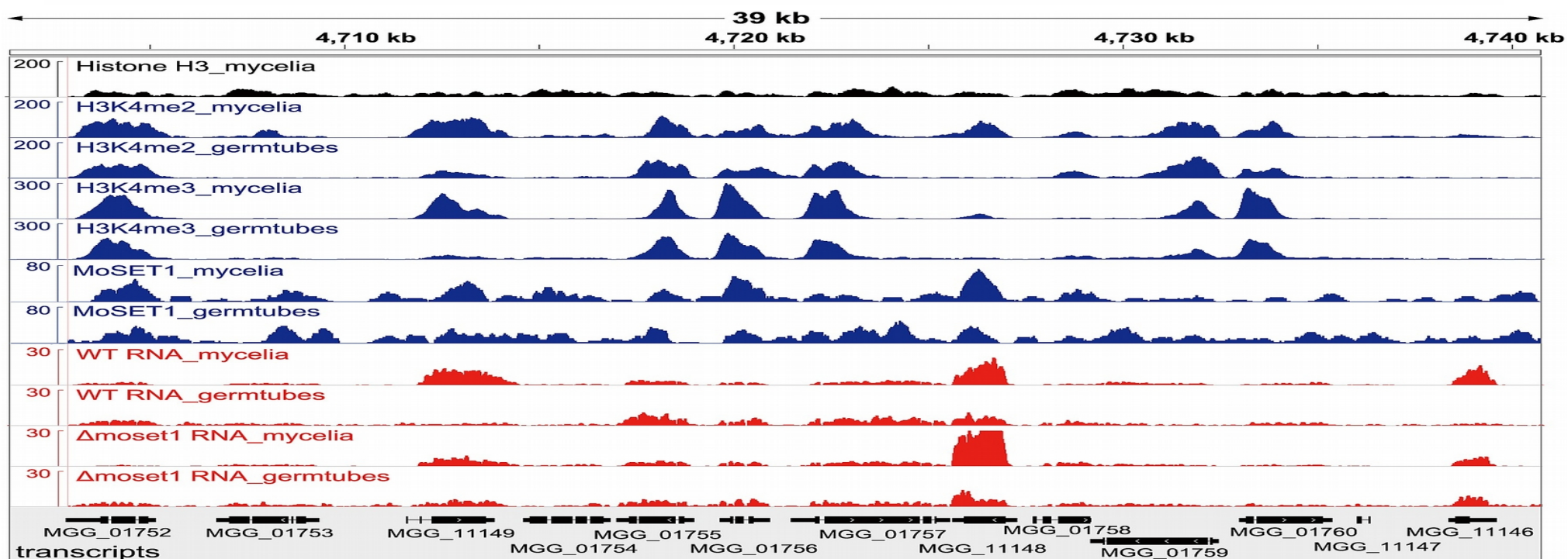
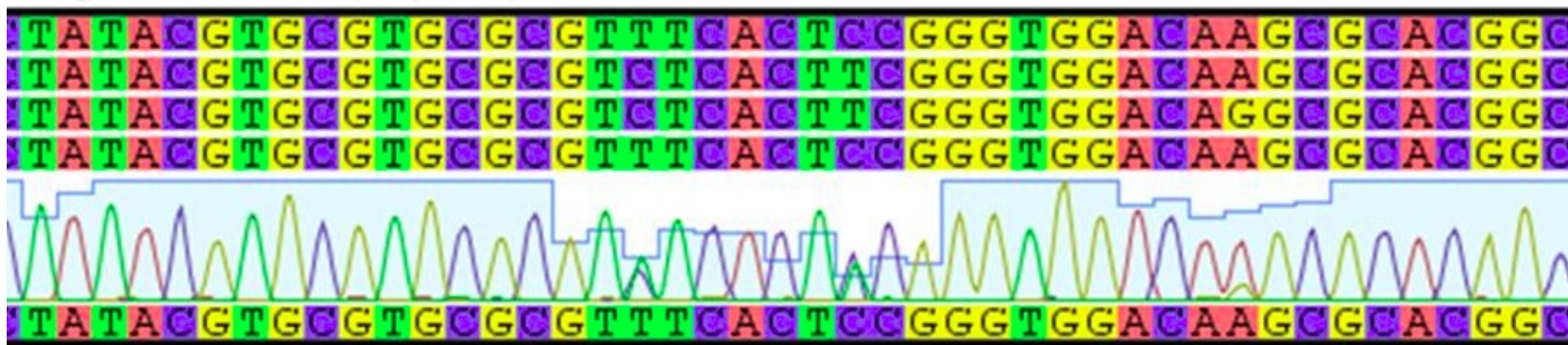
(běžně prodávané kapilární sekvenátory jsou max. 96-kapilární)

Většinou kratší sekvence – desítky bazí

(kapilární – běžně až 1000 bazí)

Sekvenování DNA

Single nucleotide polymorphisms

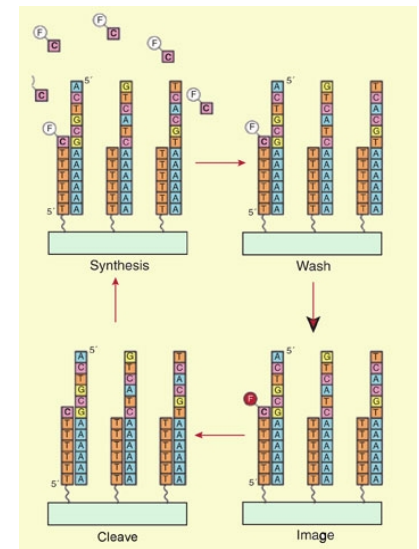


Masivně paralelní sekvenování

Sequencing by synthesis

Polymeráza

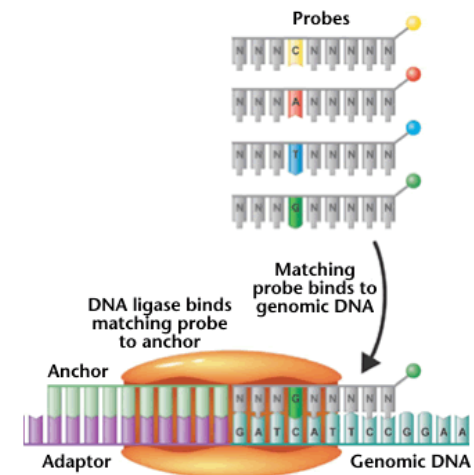
Sestavování nového řetězce z jednotlivých nukleotidů



Sequencing by ligation

Ligáza

Sestavování nového řetězce z oligonukleotidů



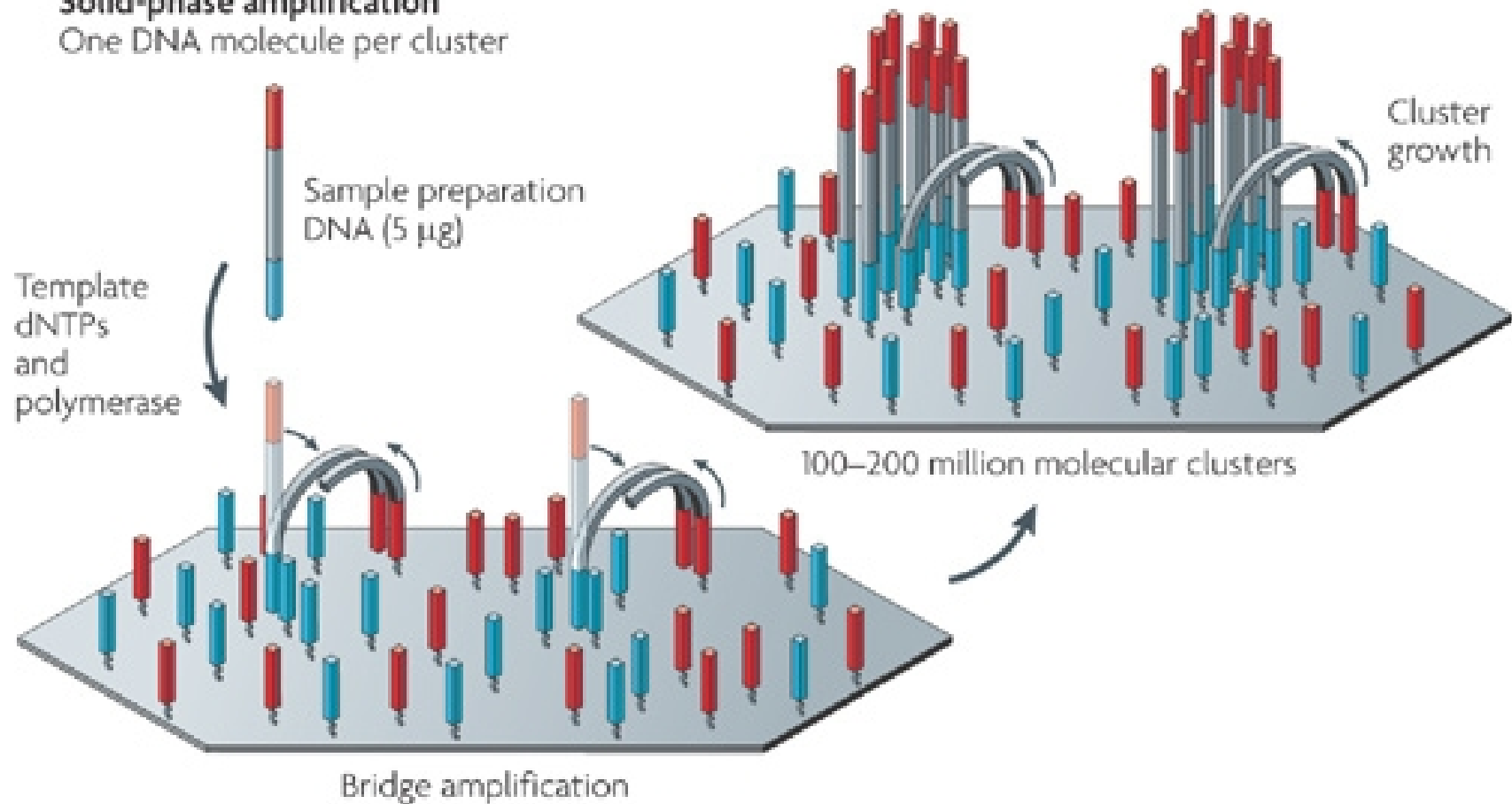
Non-enzymatic sequencing

Nanopory, elektronová mikroskopie

Přímé čtení sekvence

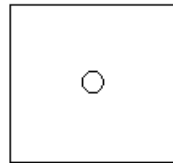
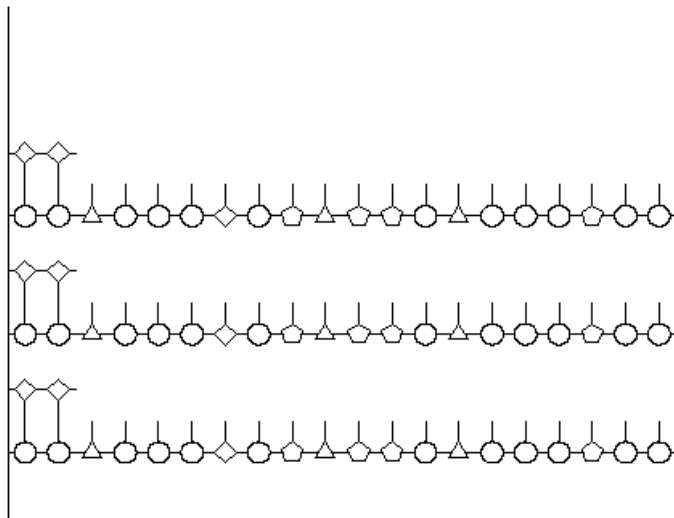
Bridge amplifikace

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



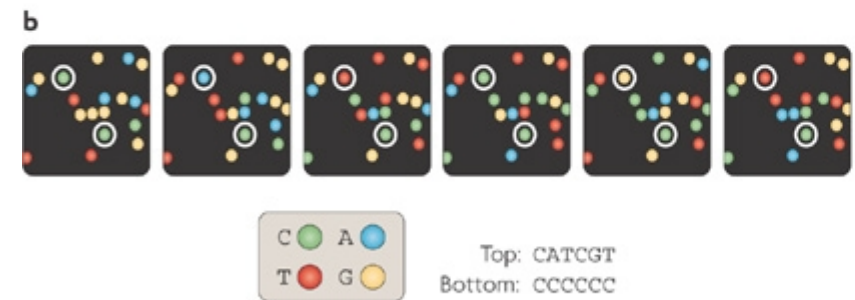
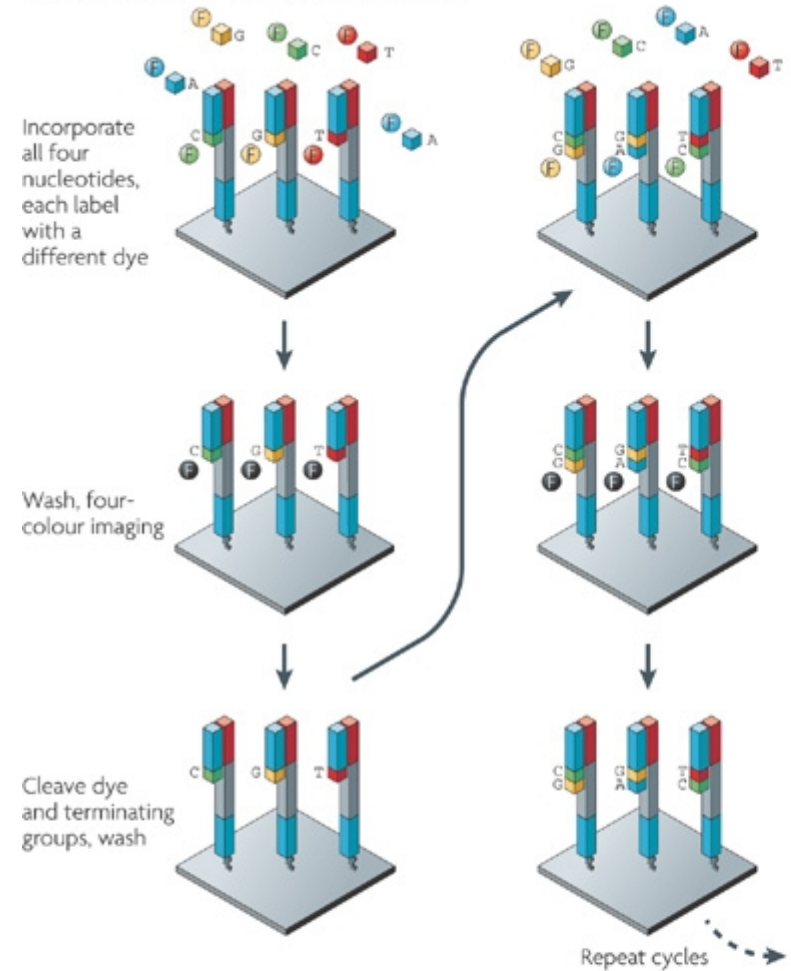
Masivně paralelní sekvenování

Sekvenování s reverzibilními terminátory



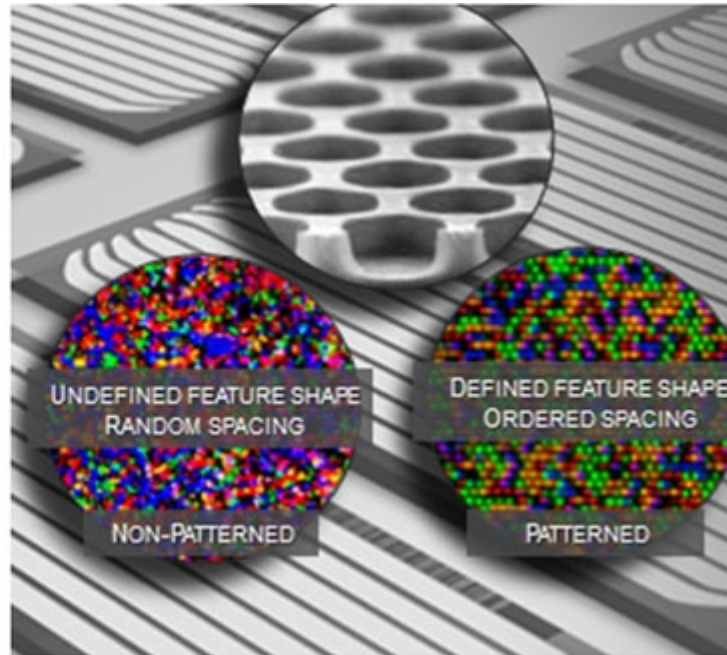
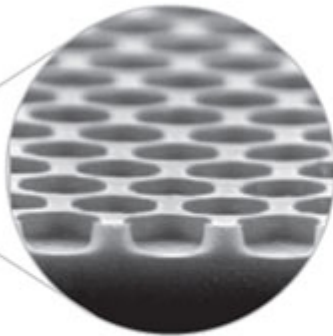
Technologie Illumina

a Illumina/Solexa — Reversible terminators



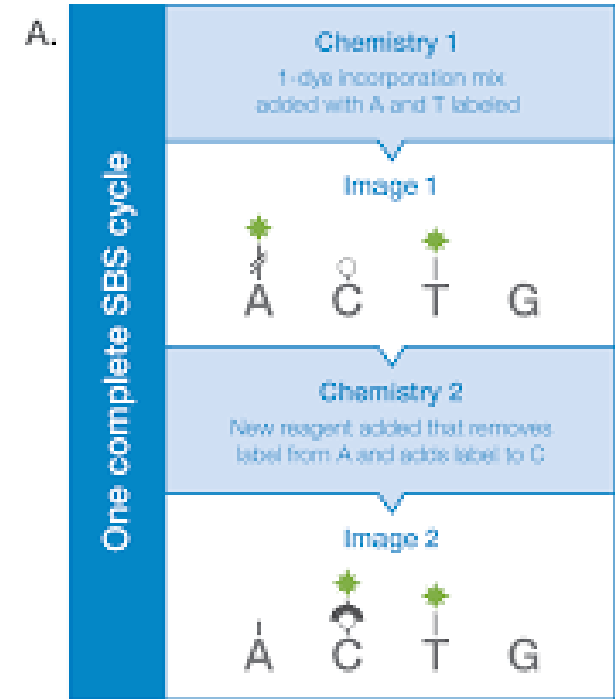
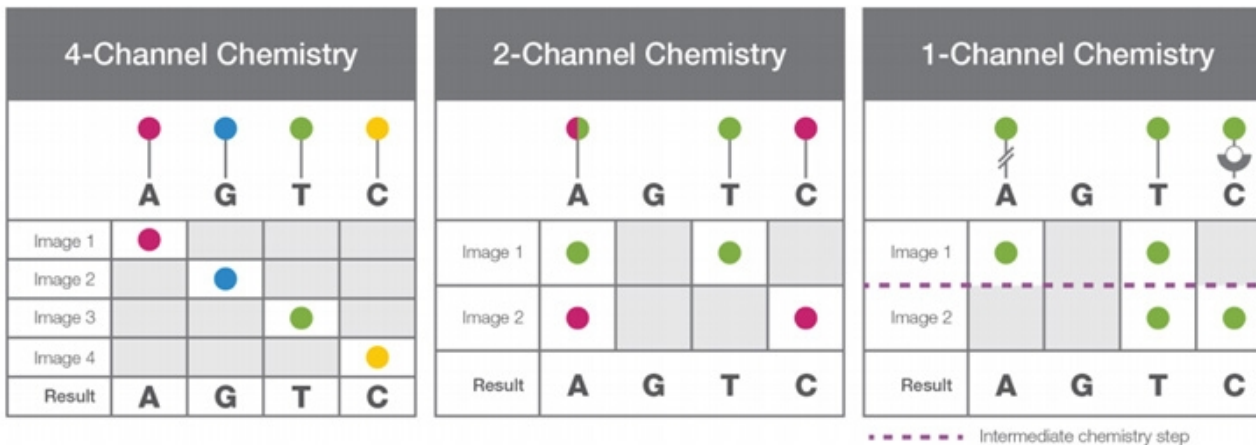
<https://www.youtube.com/watch?v=fCd6B5HRaZ8>

Patterned flowcell + exclusive amplification



<https://www.youtube.com/watch?v=fCd6B5HRaZ8>
<https://www.youtube.com/watch?v=DJQn-qA6tTw>

Sekvenování s reverzibilními terminátory



B.

Image 1	Image 2	Result
ON	OFF	A
OFF	ON	C
ON	ON	T
OFF	OFF	G

Masivně paralelní sekvenování

Technologie Illumina



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



NovaSeq

Kapacita 48 genomů/běh, 6TB/běh



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

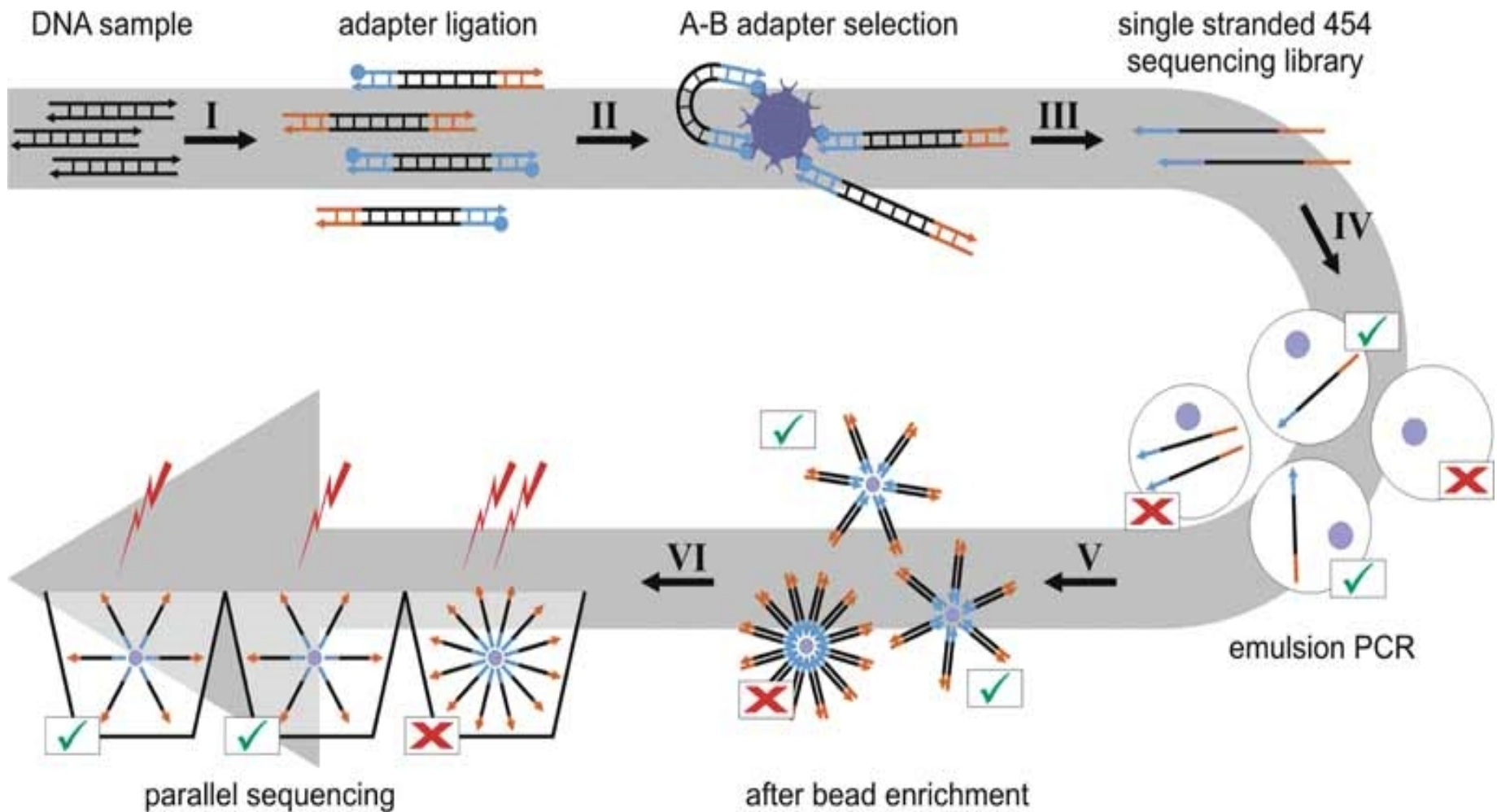
Kapacita 0,07
genomu/běh,
7,5GB/běh



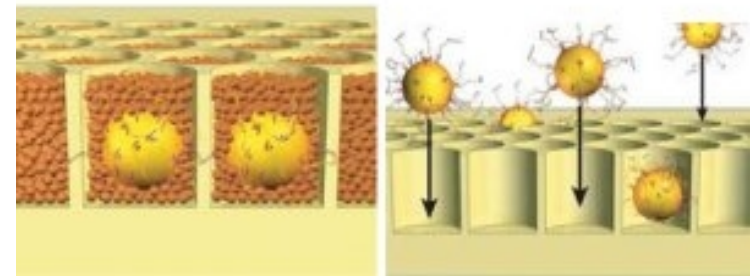
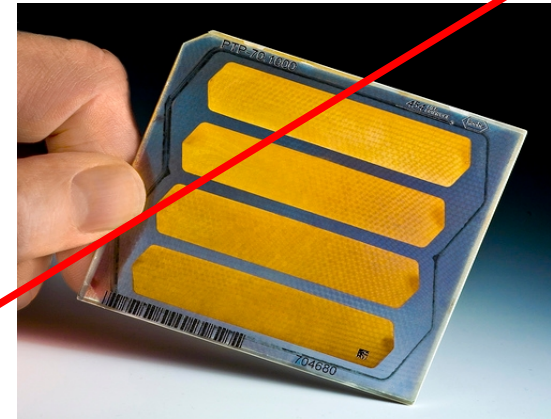
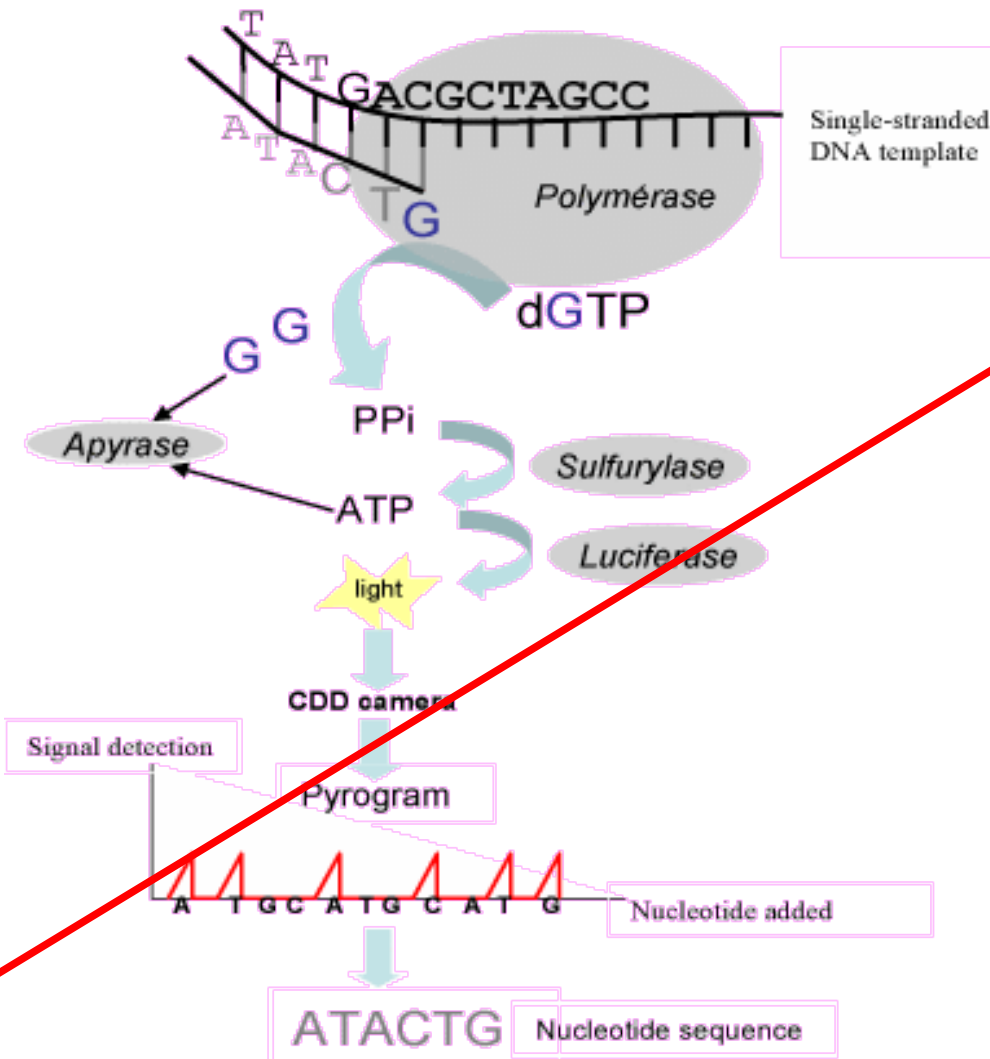
iSeq

Kapacita 0,01
genomu/běh,
1,2GB/běh

Emulzní PCR

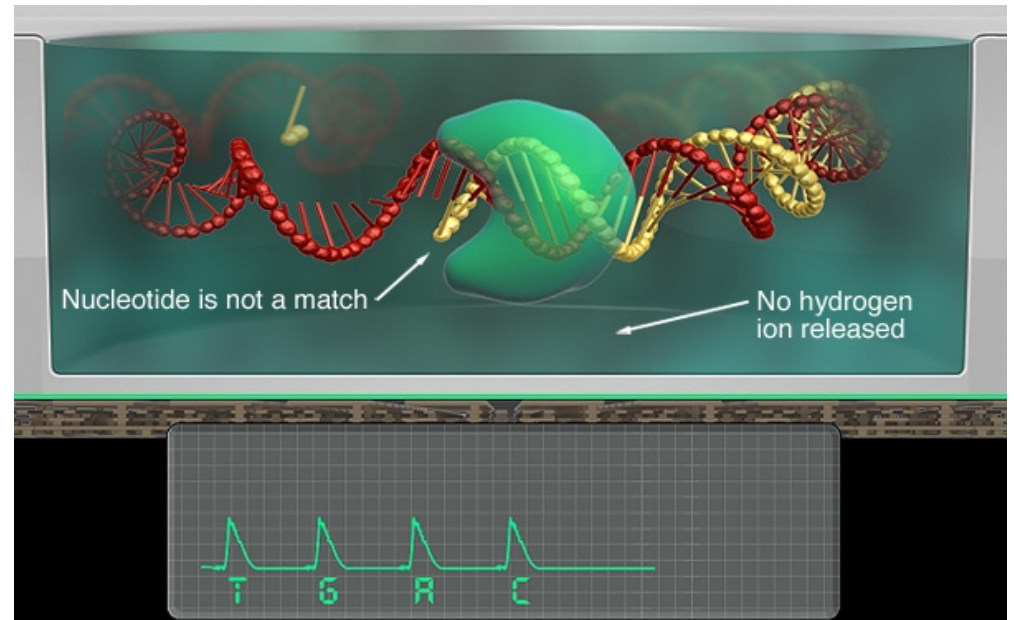
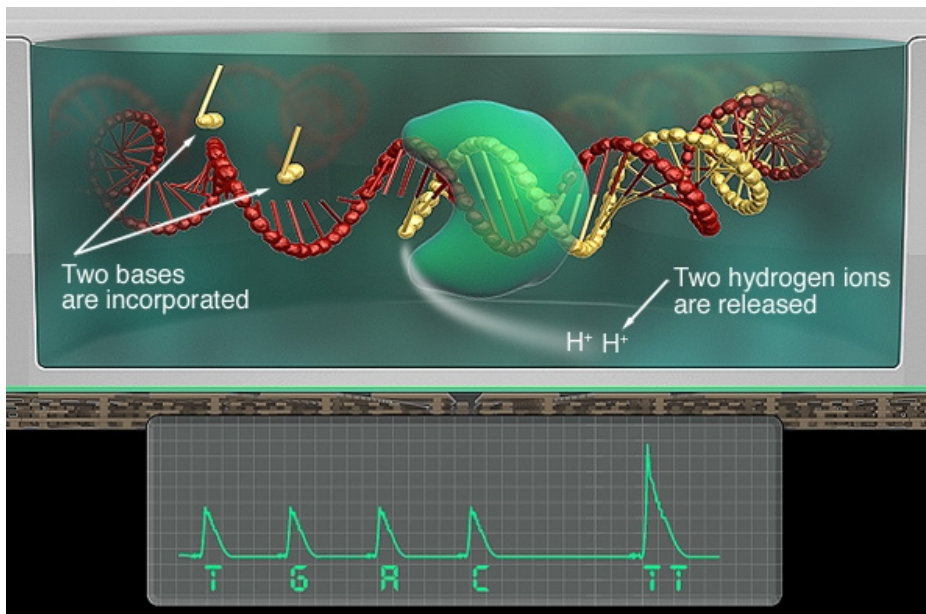
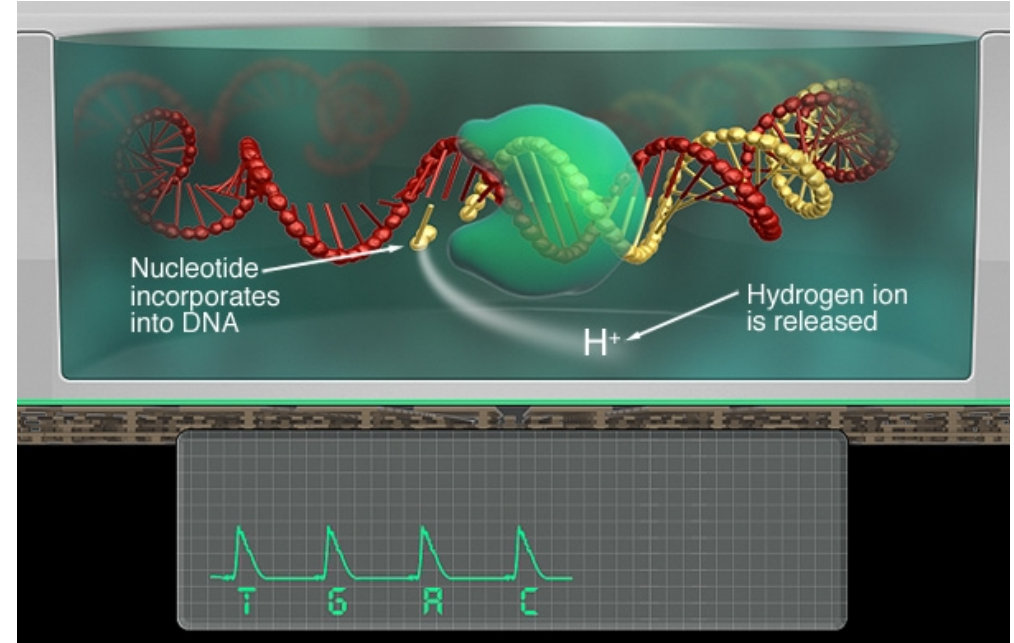
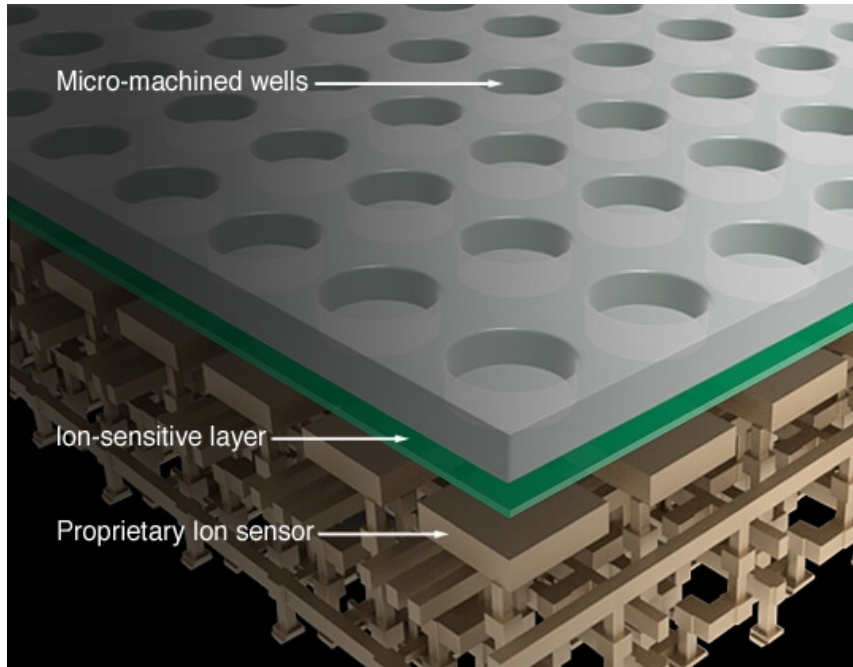


Pyrosekvenování



Masivně paralelní sekvenování

Technologie Ion Torrent



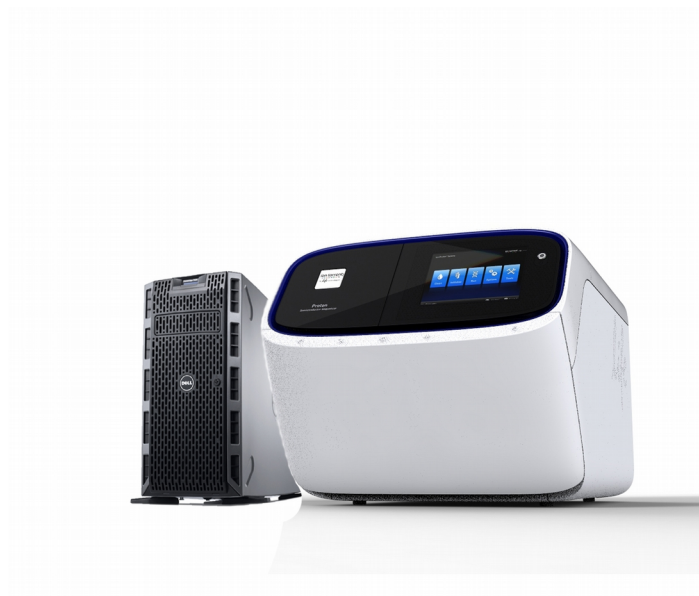
Masivně paralelní sekvenování

Technologie Ion Torrent



Ion Torrent PGM

Kapacita 2GB/běh



Ion Proton

Kapacita 10+GB/běh



Ion S5

Kapacita 10+GB/běh

Masivně paralelní sekvenování

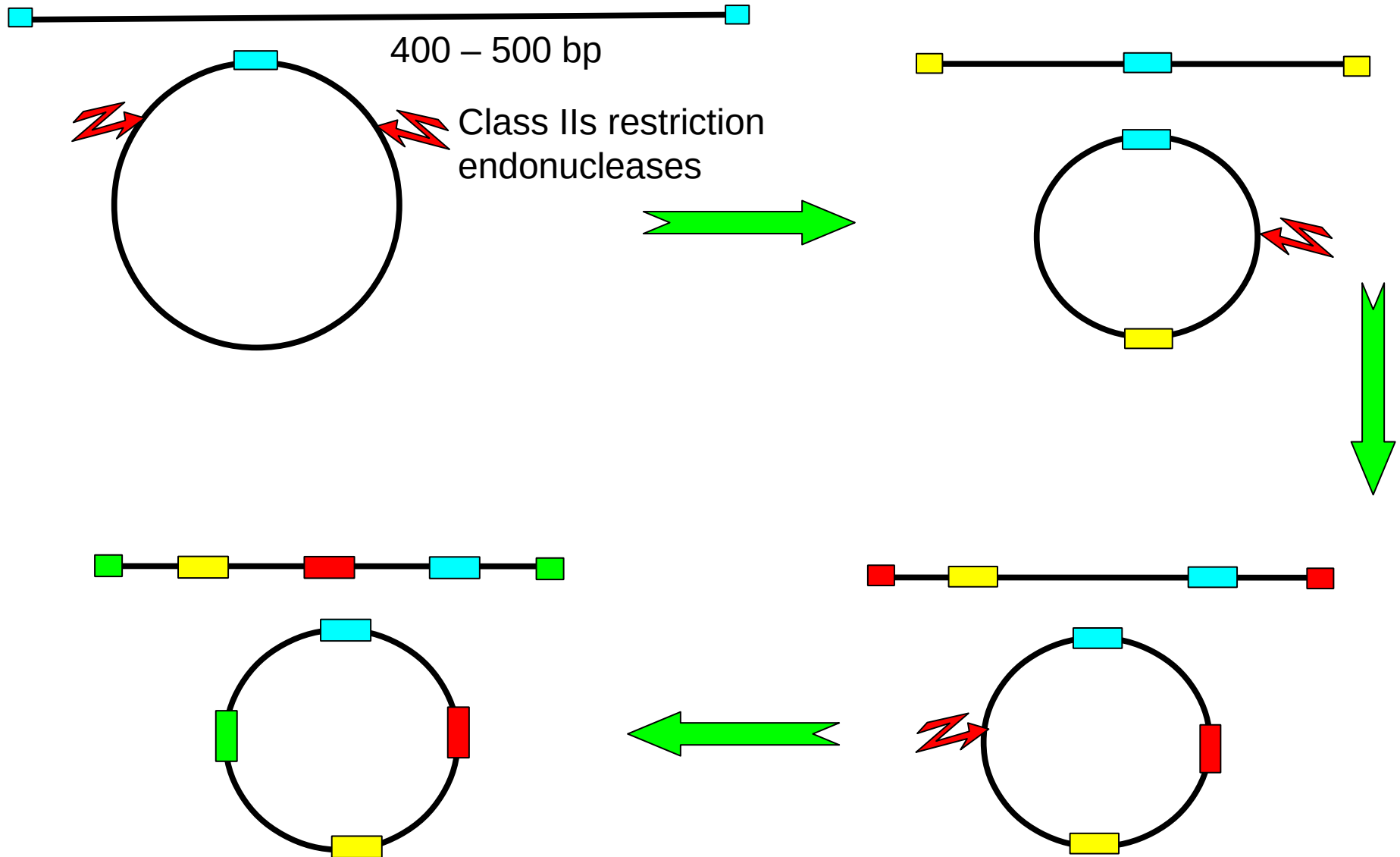
Qiagen GeneReader

Uzavřená technologie
emPCR + SBS

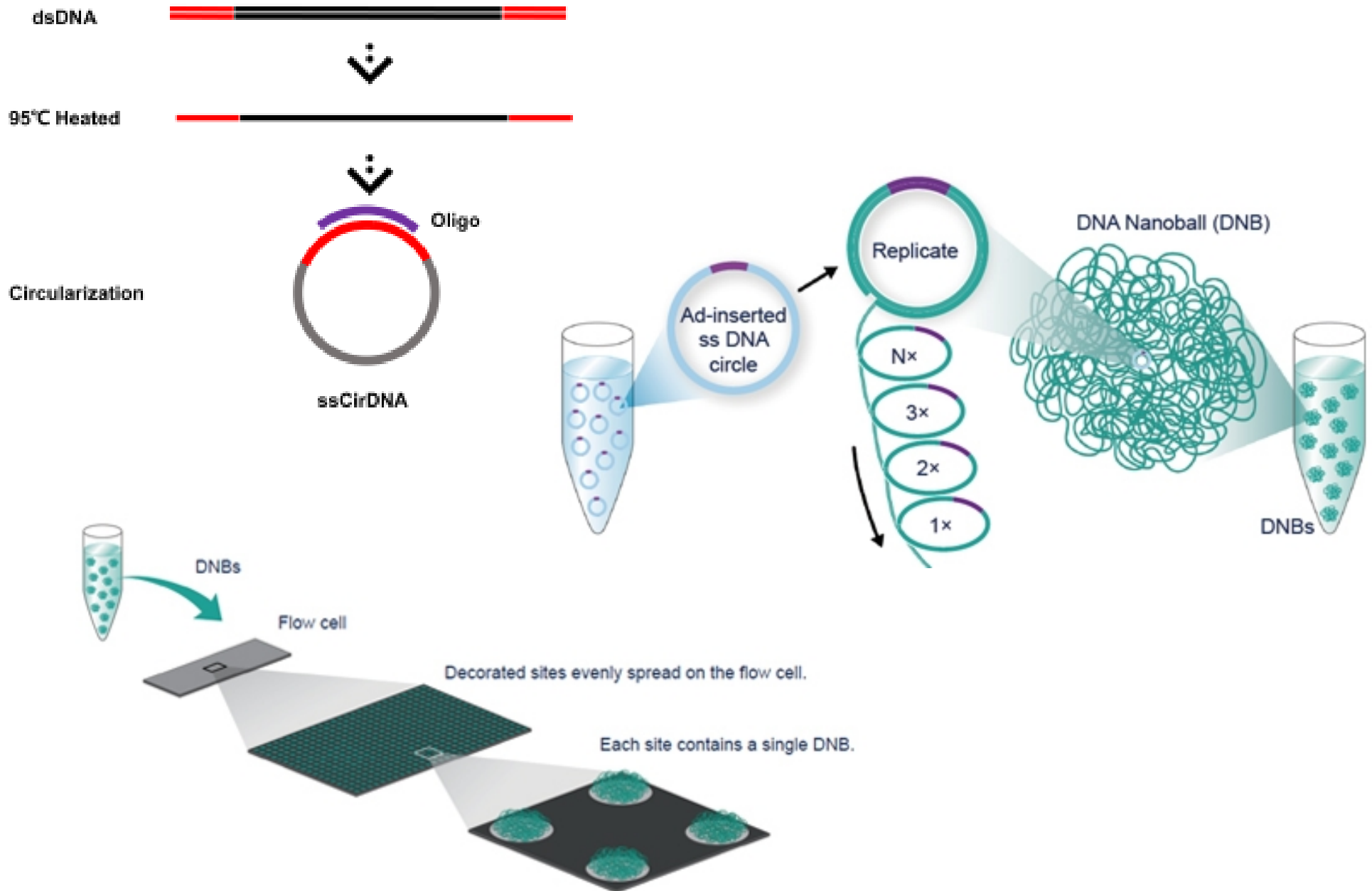


Masivně paralelní sekvenování

Technologie cPAL



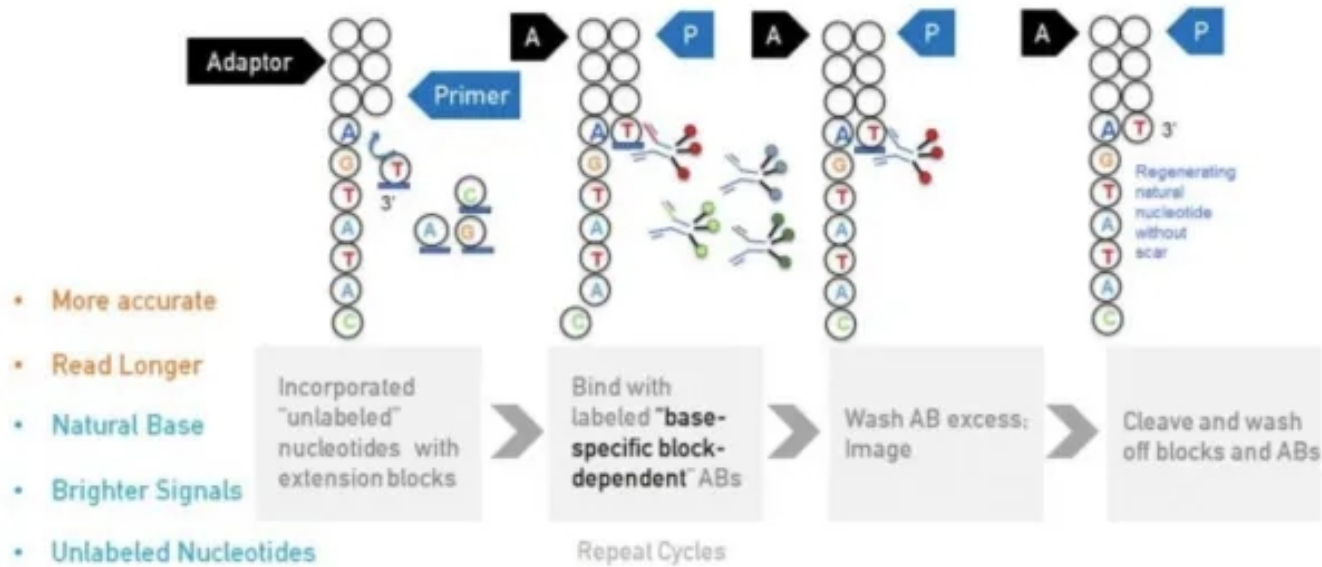
Masivně paralelní sekvenování



Masivně paralelní sekvenování

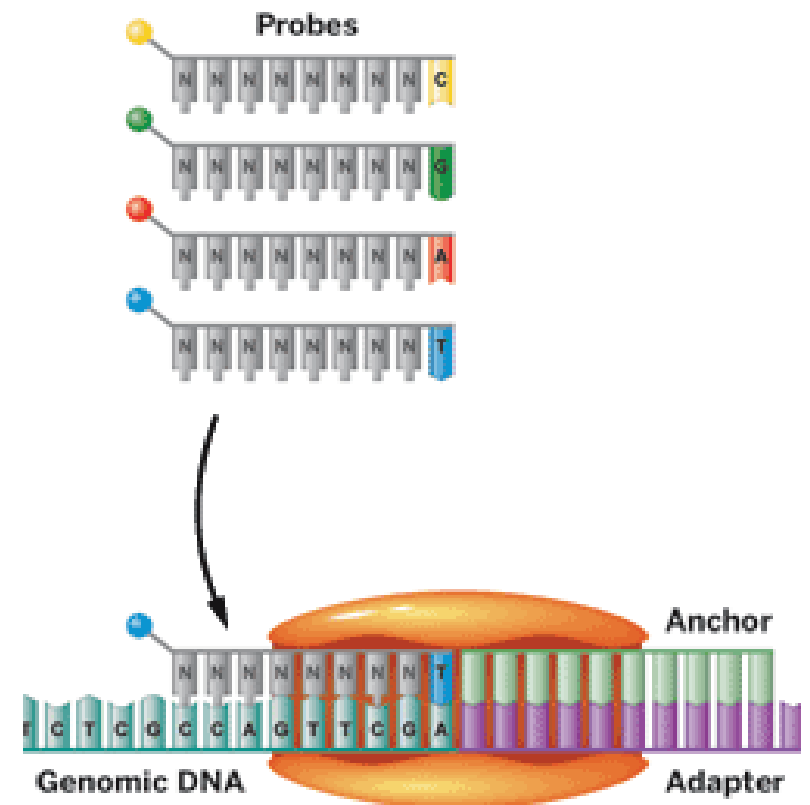
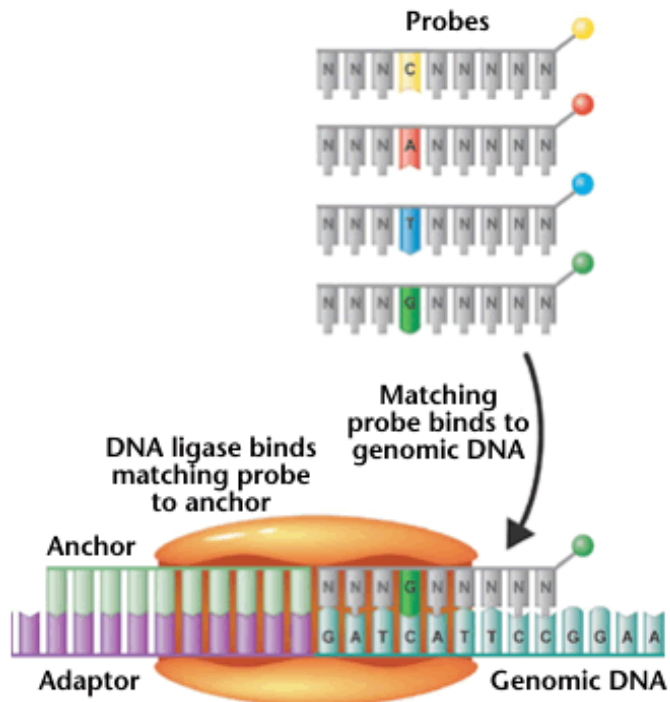
CoolNGS Chemistry in cPAS

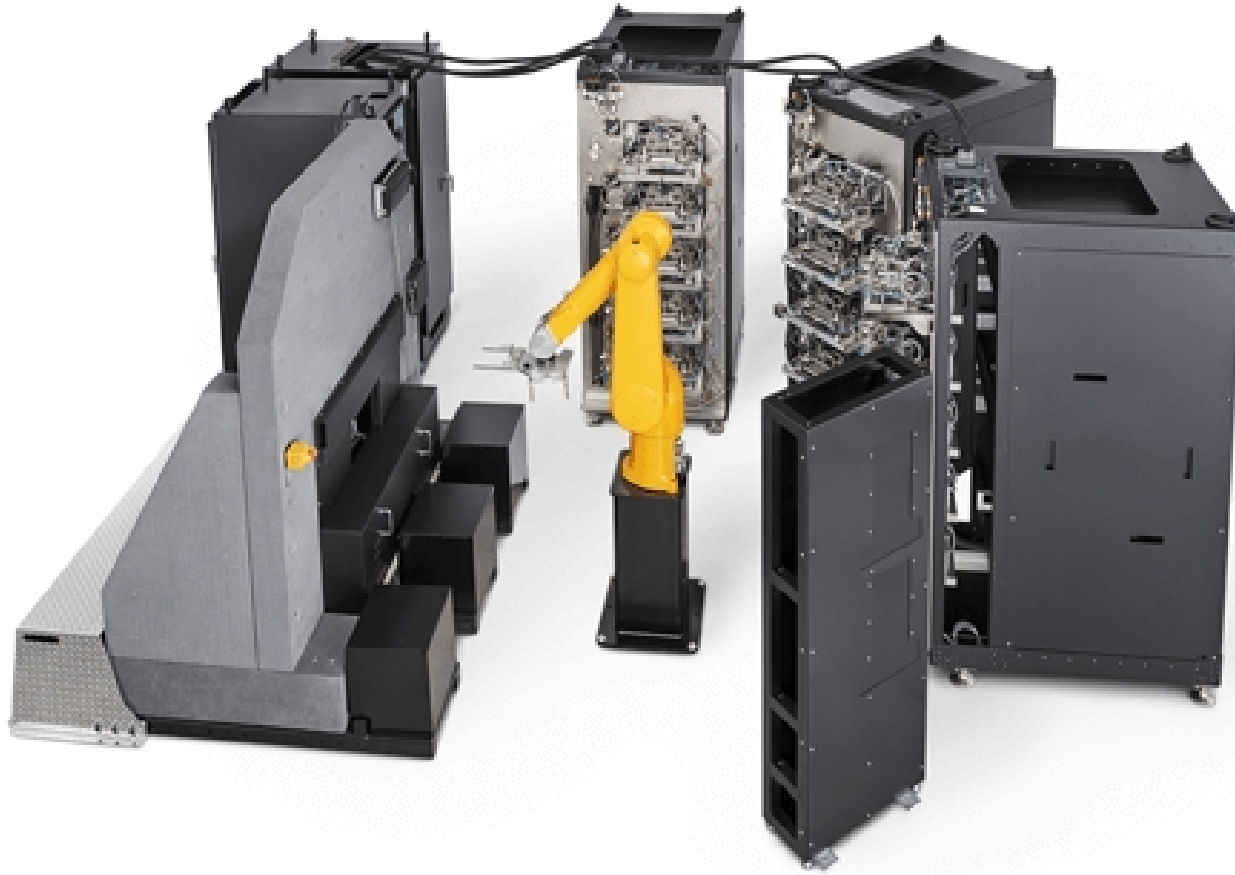
Unlabeled Nucleotides and Natural Base



Masivně paralelní sekvenování

Sekvenování (hybridizací a) ligací





Kompletní systém pro sekvenování lidských genomů a exomů

Výrobce BGI (Čína)

Kapacita 12.000 genomů/rok, cena \$ 12M

Masivně paralelní sekvenování

Technologie cPAS



DNBSEQ-T7

20G/6Tb



DNBSEQ-G400

3,5G/1,4Tb



DNBSEQ-G50

300M/60Gb



BGISEQ-500

2,6G/520Gb



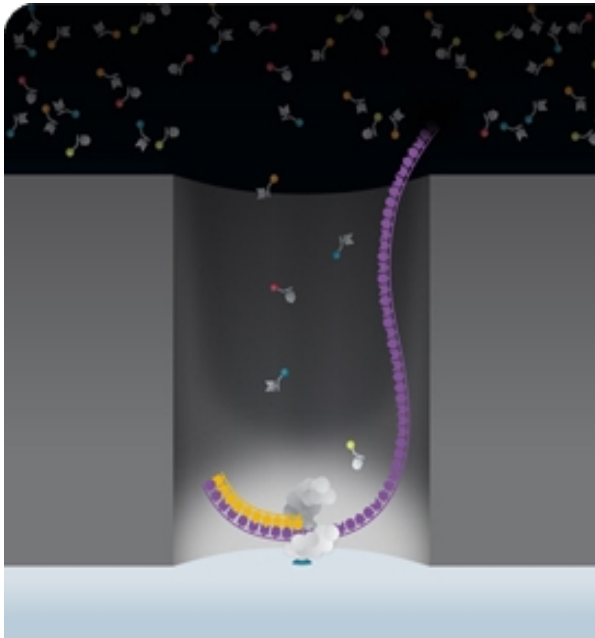
BGISEQ-50

?M/?Gb

Masivně paralelní sekvenování

Technologie SMRT

(Single Molecule Real Time)

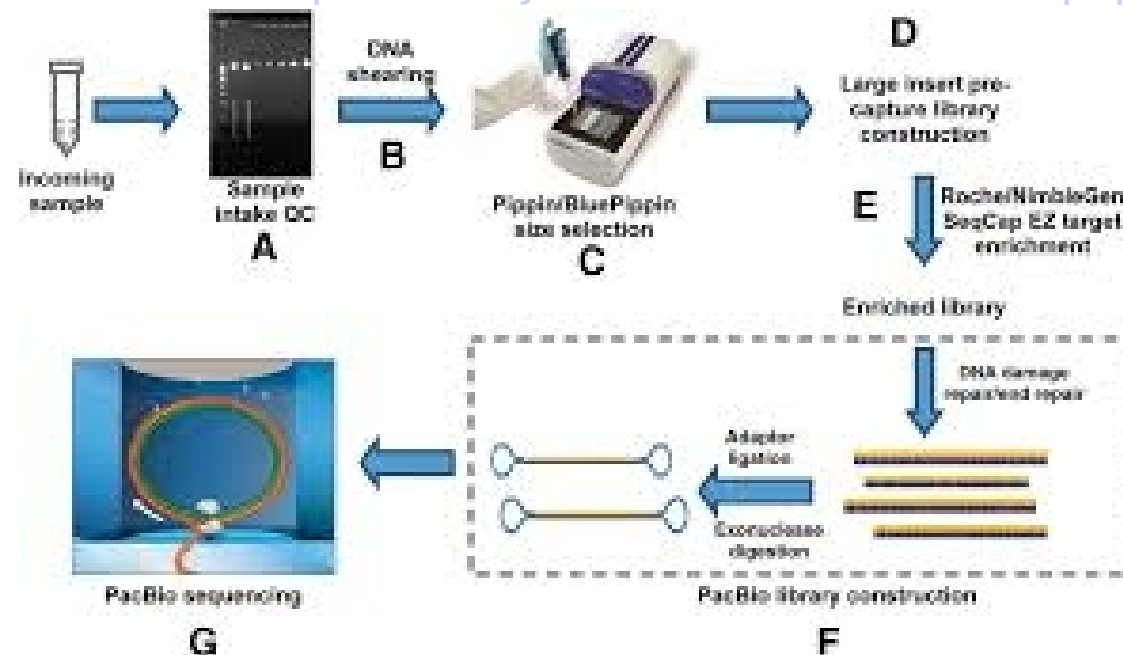


With an active polymerase immobilized at the bottom of each ZMW, nucleotides diffuse into the ZMW chamber. In order to detect incorporation events and identify the base, each of the four nucleotides A, C, G and T are labeled with a different fluorescent color. Since only the bottom 30nm of the ZMW is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

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

<https://www.youtube.com/watch?v=NHCJ8PtYCFc>

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



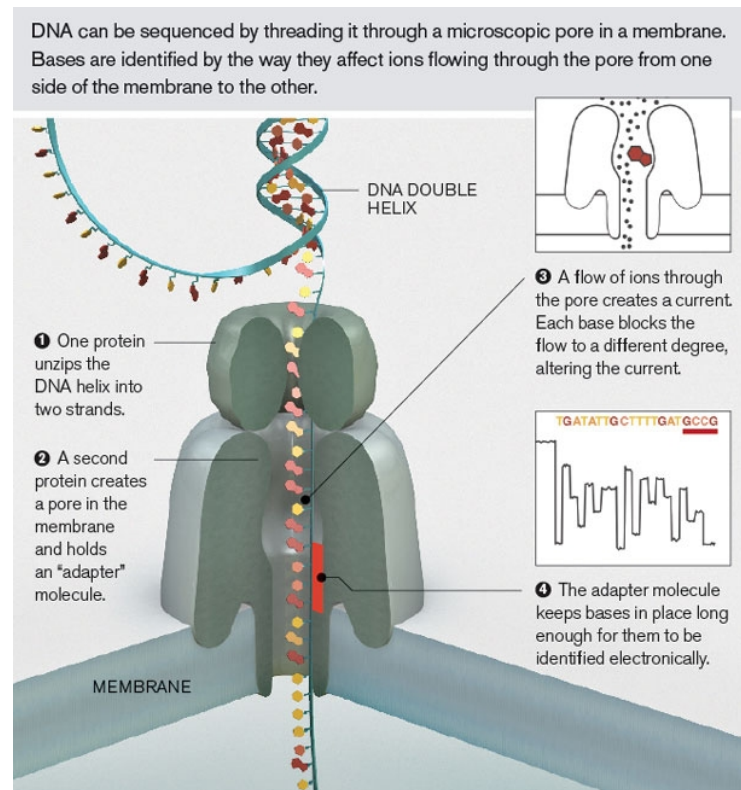
Masivně paralelní sekvenování

Oxford Nanopore



'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



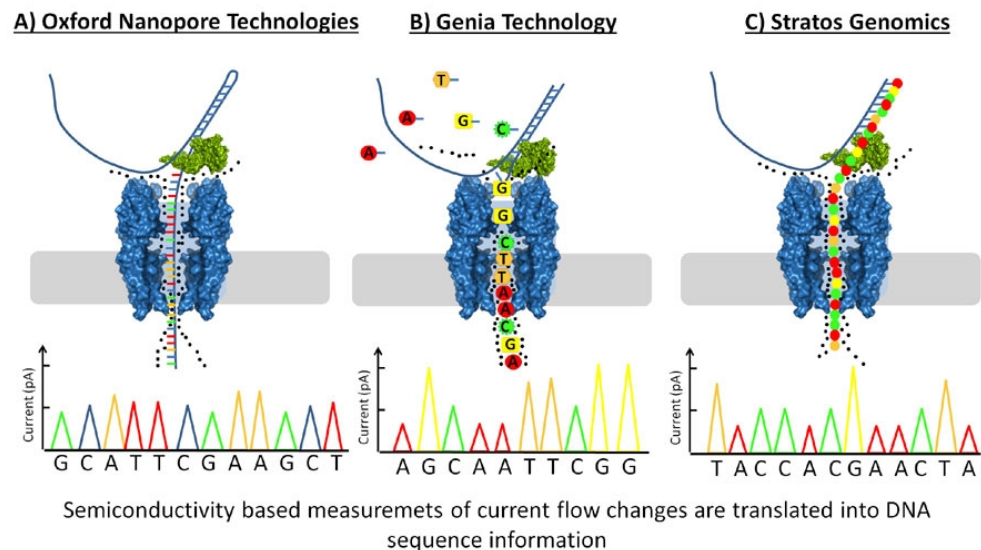
<https://www.nanoporetech.com>

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

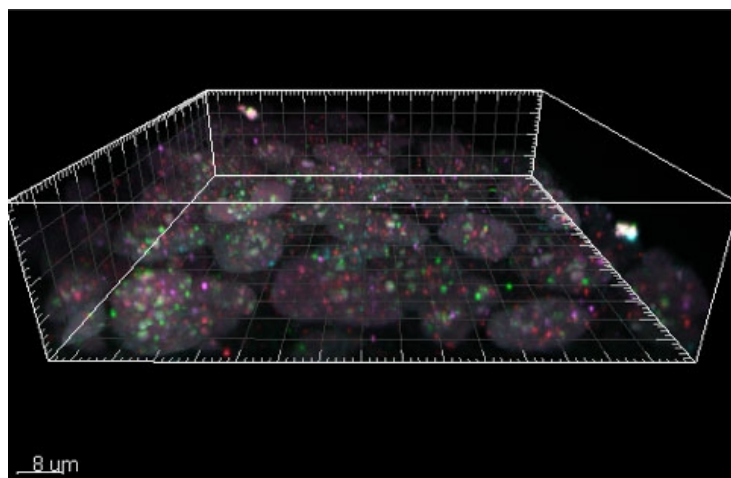
<https://www.youtube.com/watch?v=GUb1TZvMWsw>

Masivně paralelní sekvenování

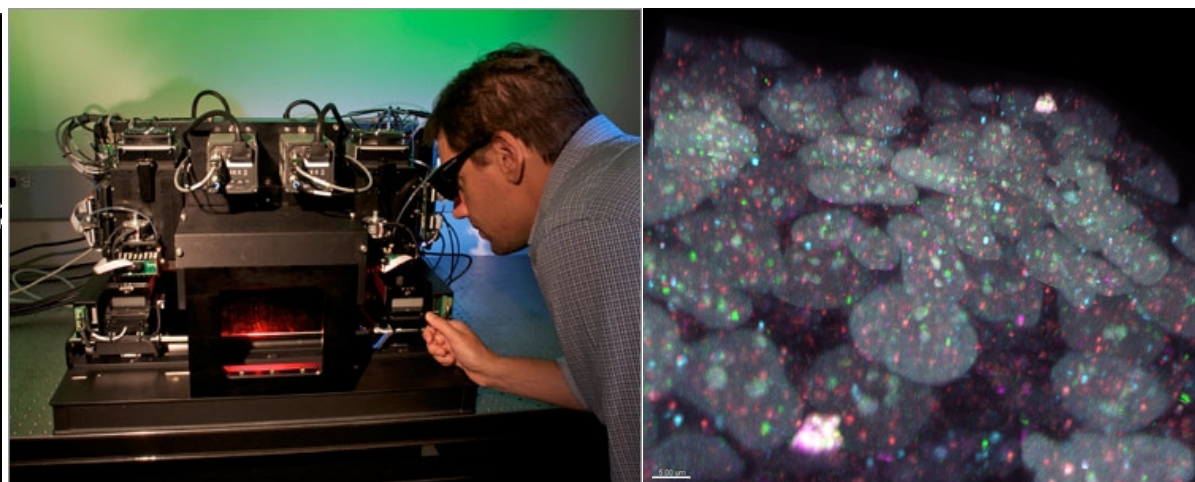
Nanopore Sequencing Technologies



Fluorescent In Situ Sequencing



ReadCooR



Kontrola kvality vzorku

Metody

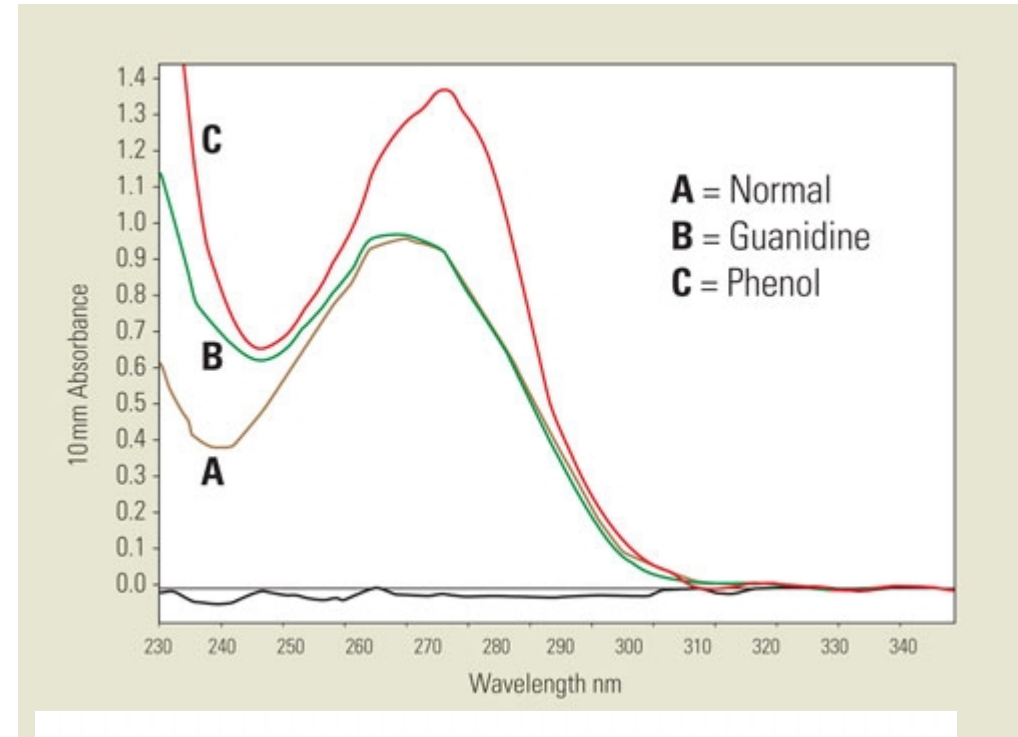
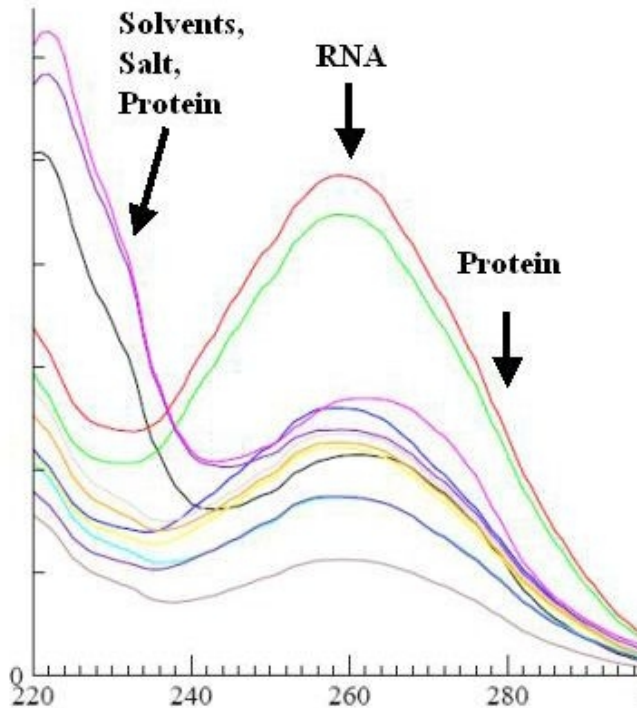
Spektrofotometrie
Fluorimetrie
Elektroforéza
PCR/qPCR

Problematické vzorky

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

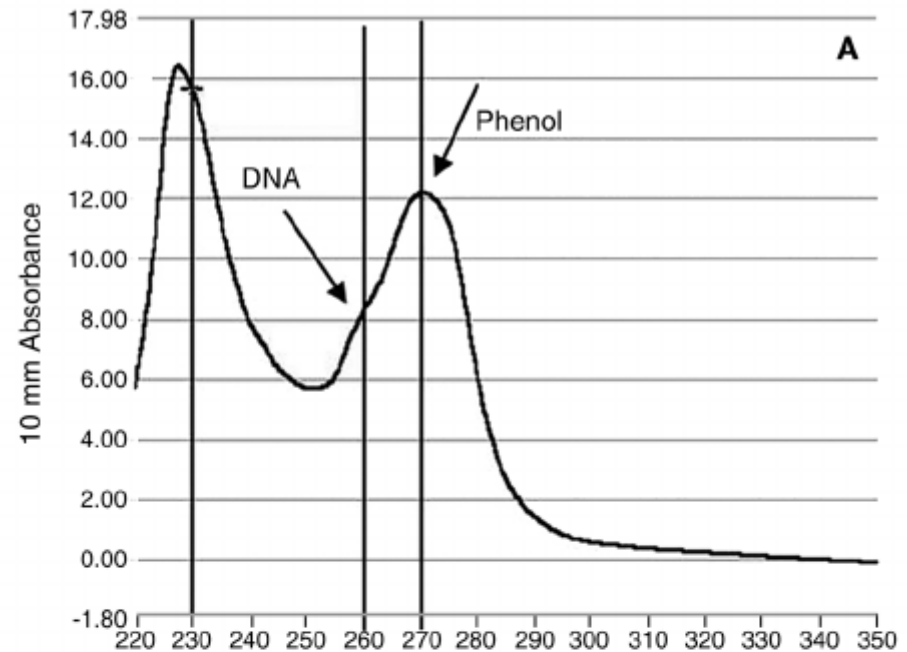
Kontrola kvality vzorku

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

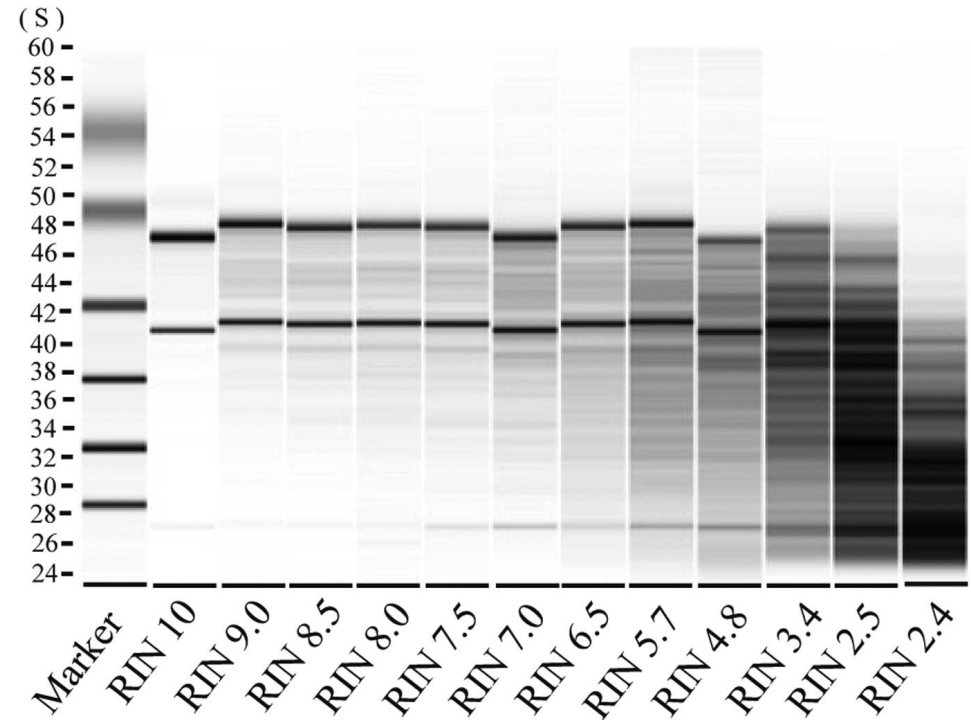
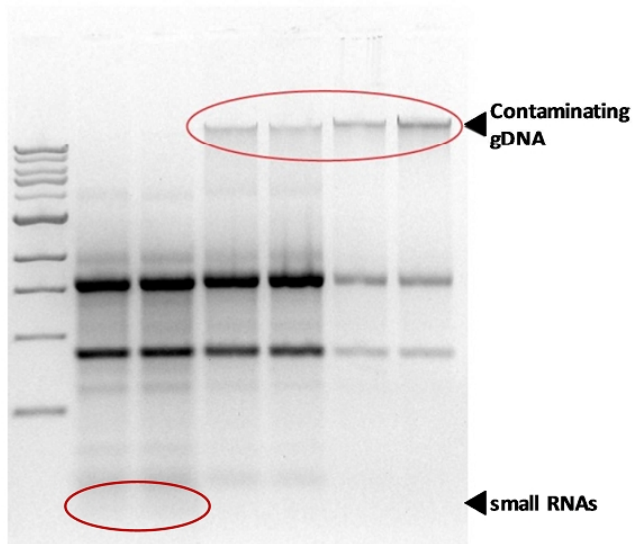
Elektroforéza

Integrita (fragmentace)
Kontaminace
Koncentrace

Agarosový gel
Fragment Analyzer
BioAnalyzer
TapeStation

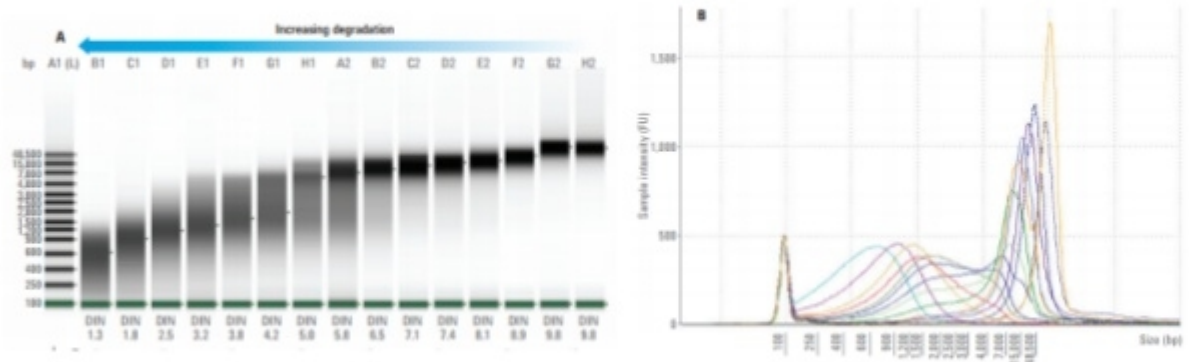
...

Zymo Research Supplier Q Supplier P



FFPE QC methods—TapeStation® Instrument (Agilent)

DNA Integrity Number (DIN)

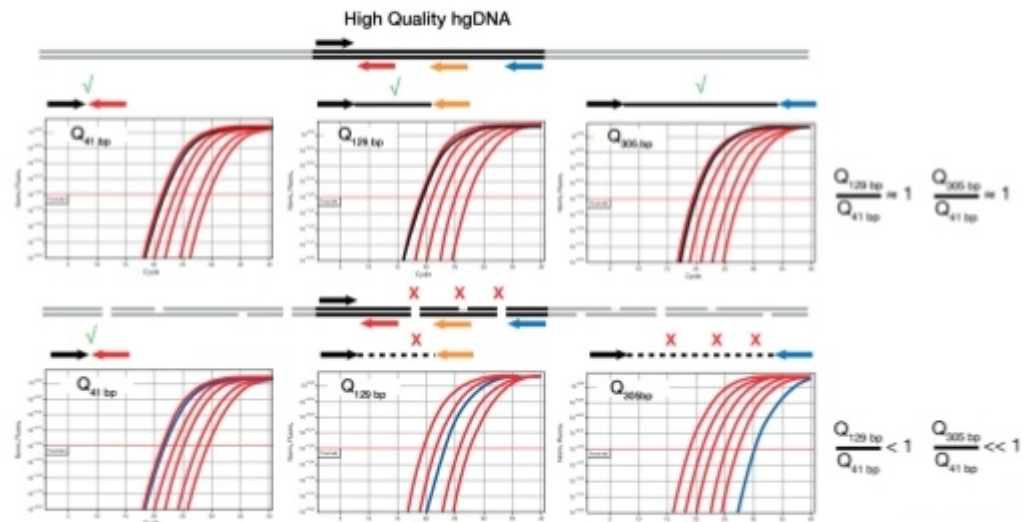


Kontrola kvality vzorku

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



Děkuji za pozornost



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

www.ceitec.cz | info@ceitec.cz



EVROPSKÁ UNIE
EVROPSKÝ FOND PRO REGIONÁLNÍ ROZVOJ
INVESTICE DO VAŠÍ BUDOUCNOSTI



OP Výzkum a vývoj
pro inovace

