



Středoevropský technologický institut
BRNO | ČESKÁ REPUBLIKA

Masivně paralelní sekvenování

Boris Tichý

Sdílená laboratoř Genomika

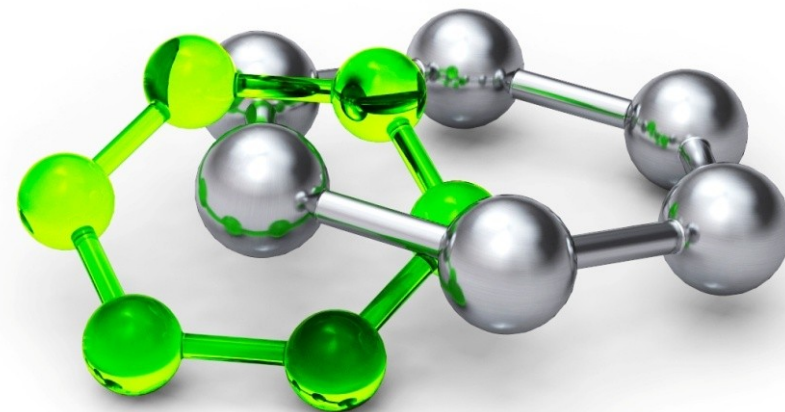
Brno, 9.11.2021



EVROPSKÁ UNIE
EVROPSKÝ FOND PRO REGIONÁLNÍ ROZVOJ
INVESTICE DO VAŠÍ BUDOUCNOSTI



OP Výzkum a vývoj
pro inovace

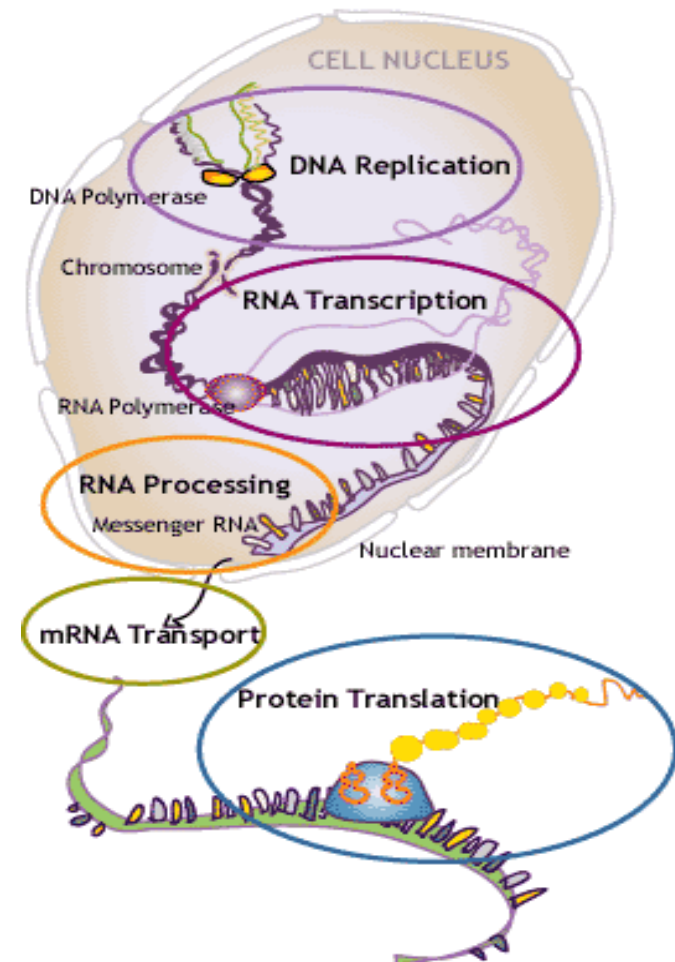
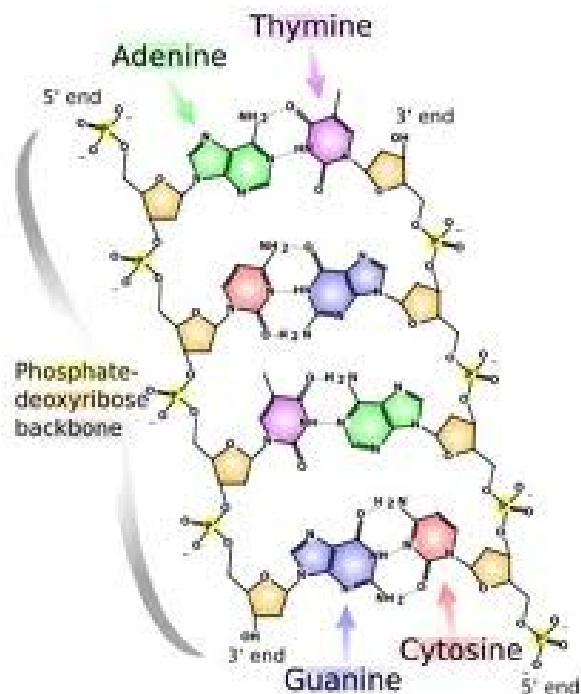


Informace je uložena v DNA

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

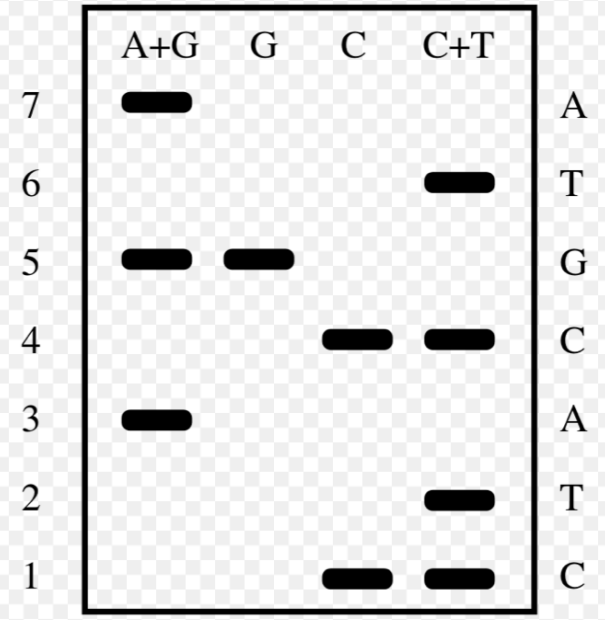
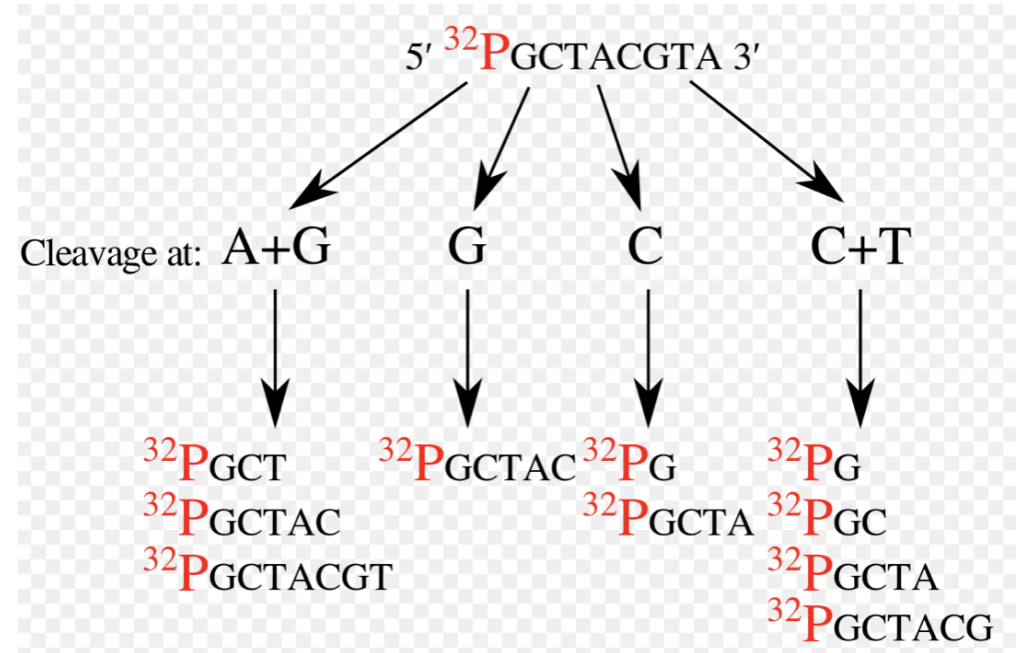
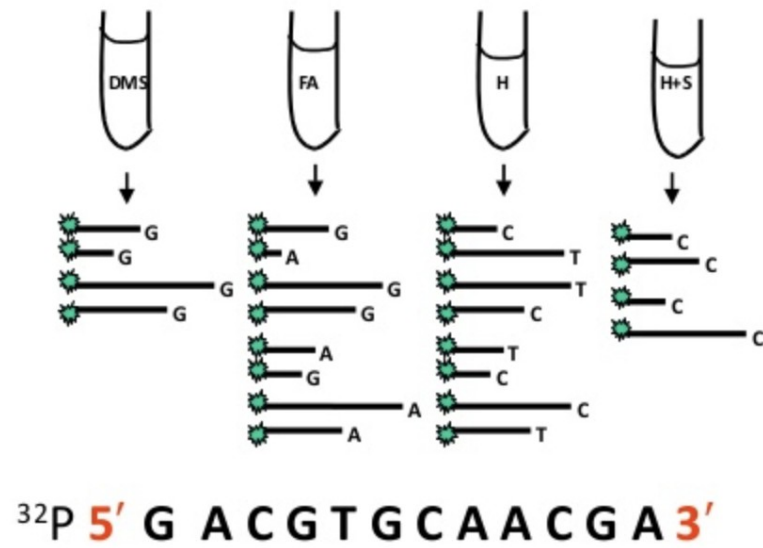
V každé lidské buňce je ~ 3 miliardy bazí = ~ 3 metry = ~ 6.6 pikogramů

Sekvence DNA je v každé buňce stejná



Sekvenování DNA

Maxam-Gilbert sequencing
- chemické sekvenování



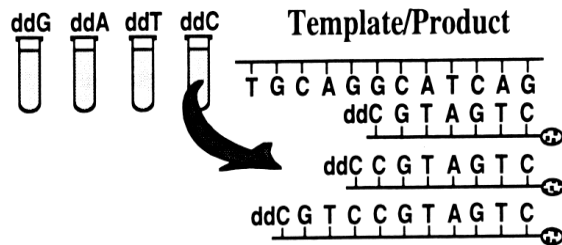
Sequencing Gel

Sekvenování DNA

Sanger sequencing

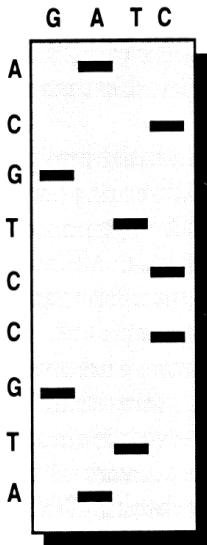


Add dNTPs and Polymerase

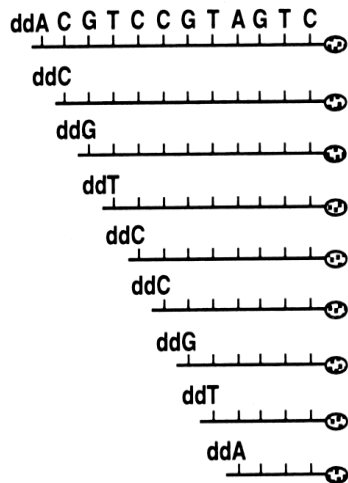


b.

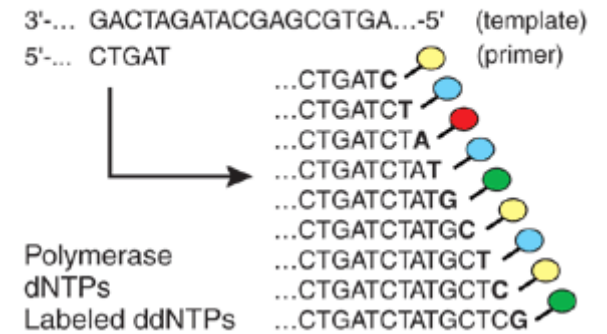
Denaturing Gel



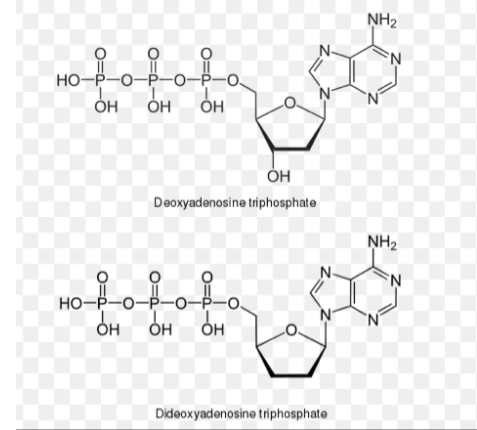
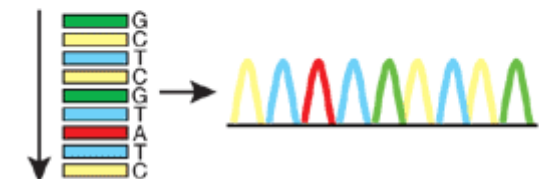
Labeled Strands



Cycle sequencing



Electrophoresis
(1 read/capillary)



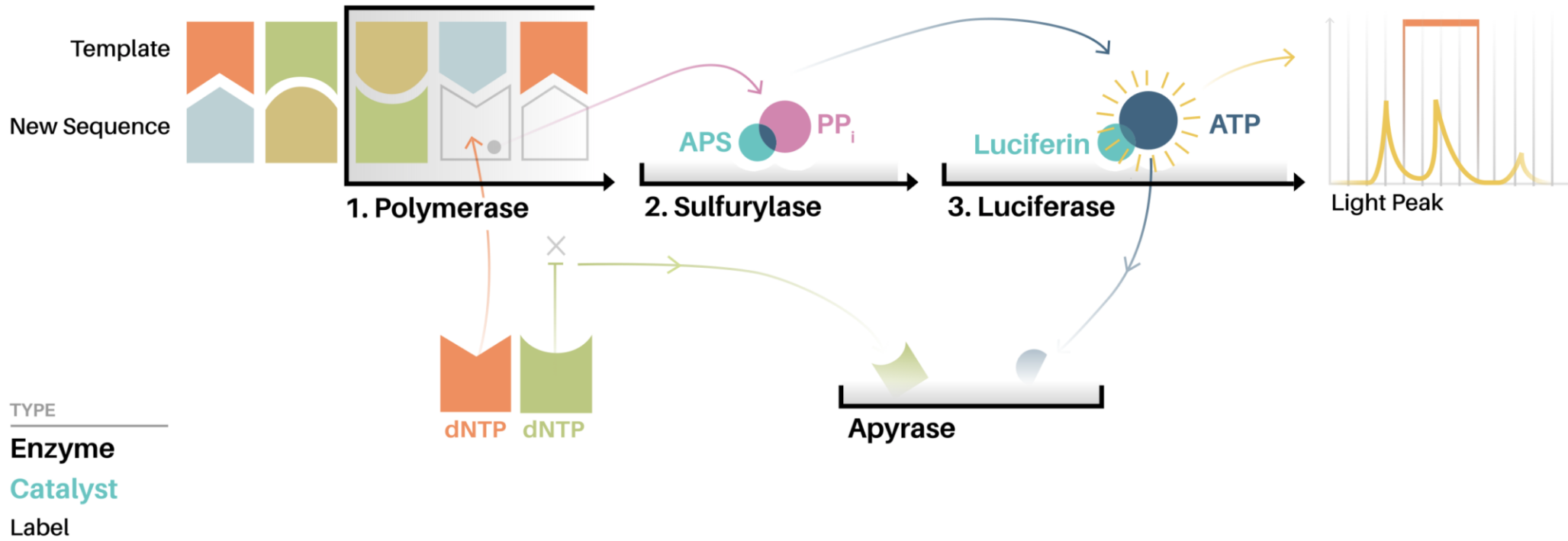
Vytvoření různě dlouhých fragmentů DNA

Gel → kapilární elektroforéza

Značené primery nebo ddNTPs

Sekvenování DNA

Pyrosequencing



adenosine 5' phosphosulfate (APS)

Masivně paralelní sekvenování

PCR amplifikace jednotlivých DNA fragmentů

nebo

Sekvenování jednotlivých DNA fragmentů

= Single molecule sequencing

Sekvence je čtena při syntéze nového řetězce

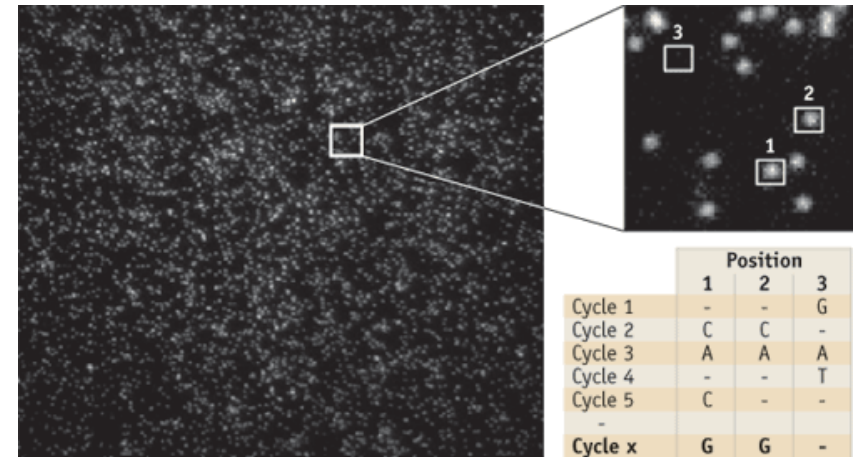
Technologie a přístroje přizpůsobeny paralelizaci

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)

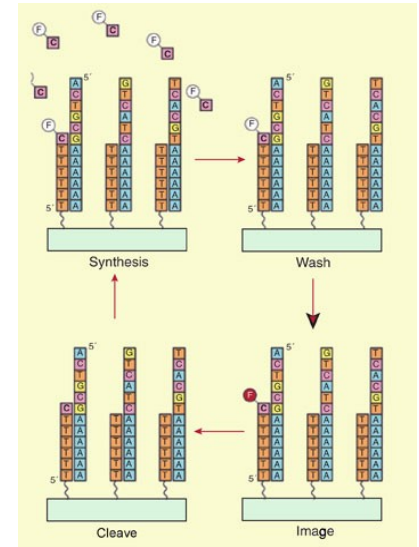


Masivně paralelní sekvenování

Sequencing by synthesis

Polymeráza

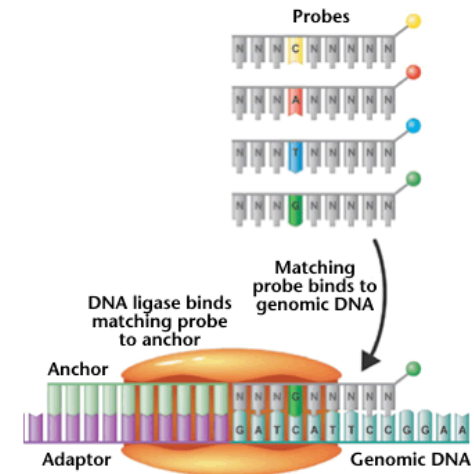
Sestavování nového řetězce z jednotlivých nukleotidů



Sequencing by ligation

Ligáza

Sestavování nového řetězce z oligonukleotidů



Non-enzymatic sequencing

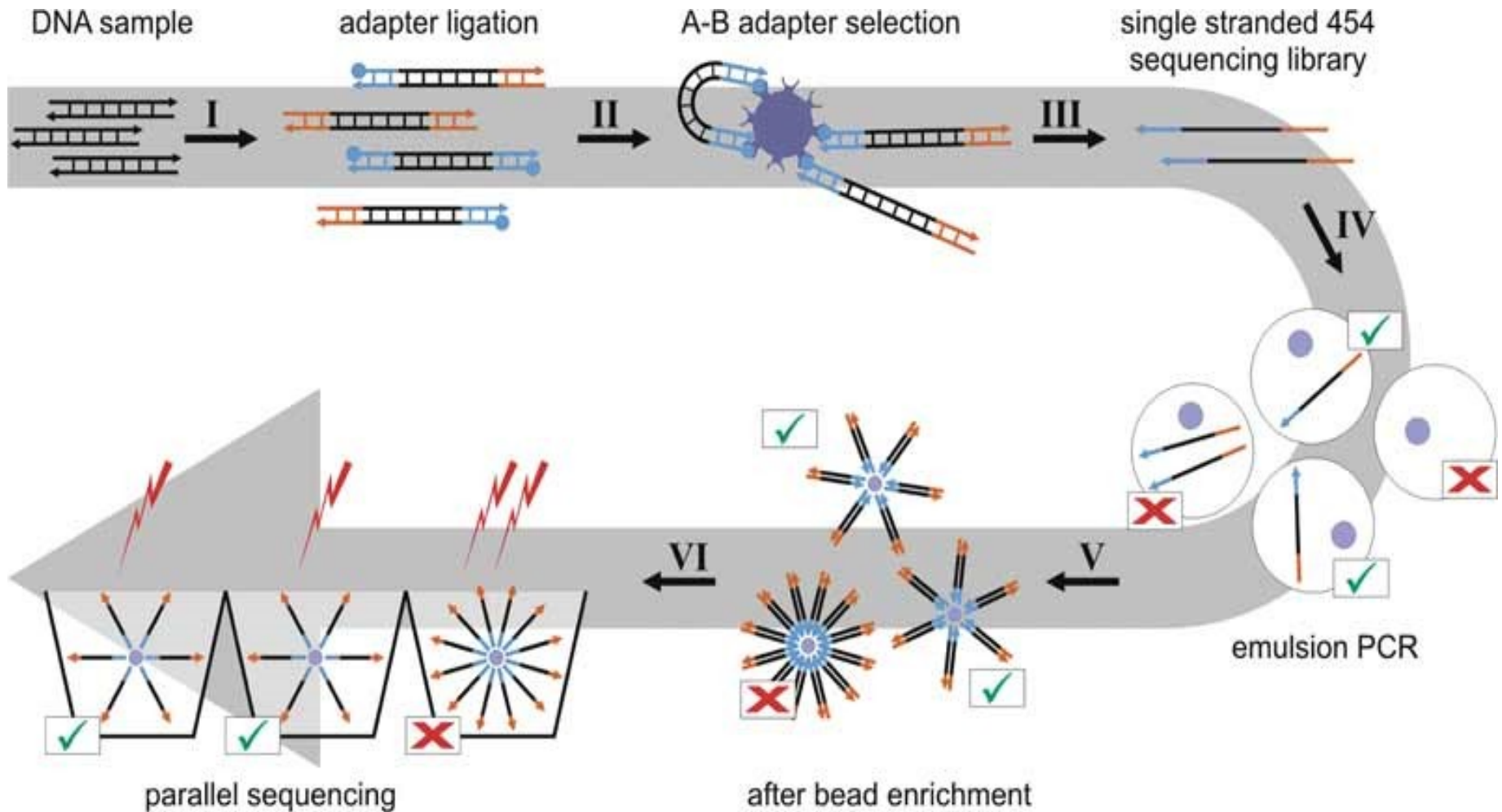
Nanopory, elektronová mikroskopie

Přímé čtení sekvence

Masivně paralelní sekvenování

Technologie Ion

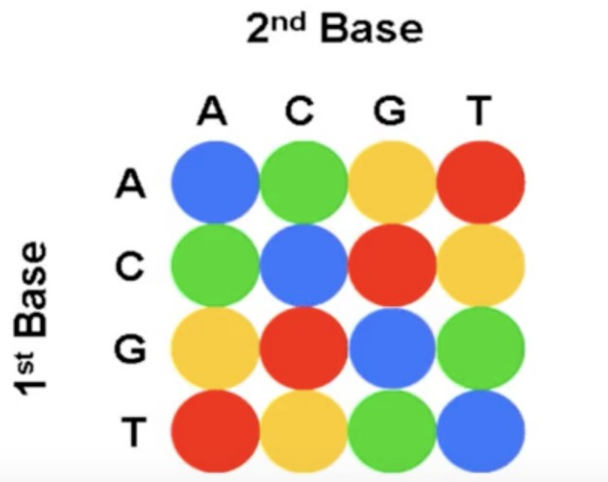
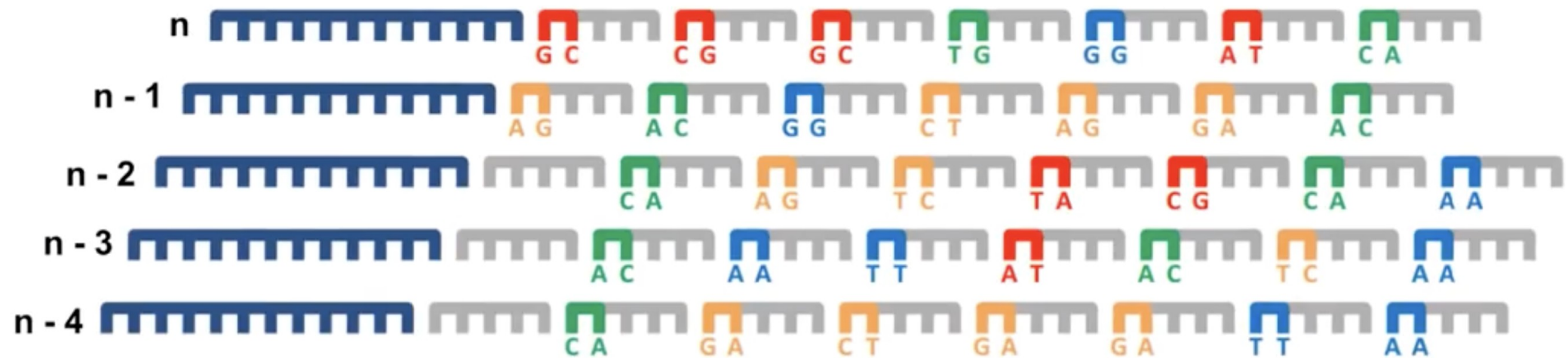
Emulzní PCR



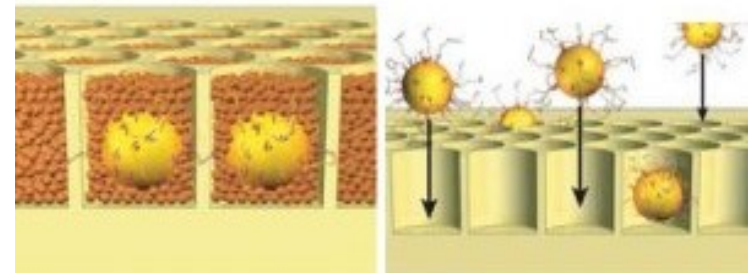
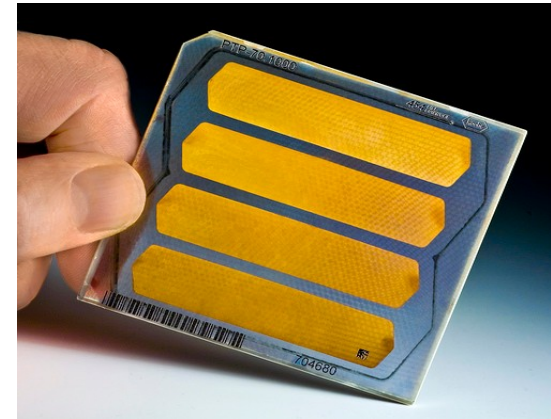
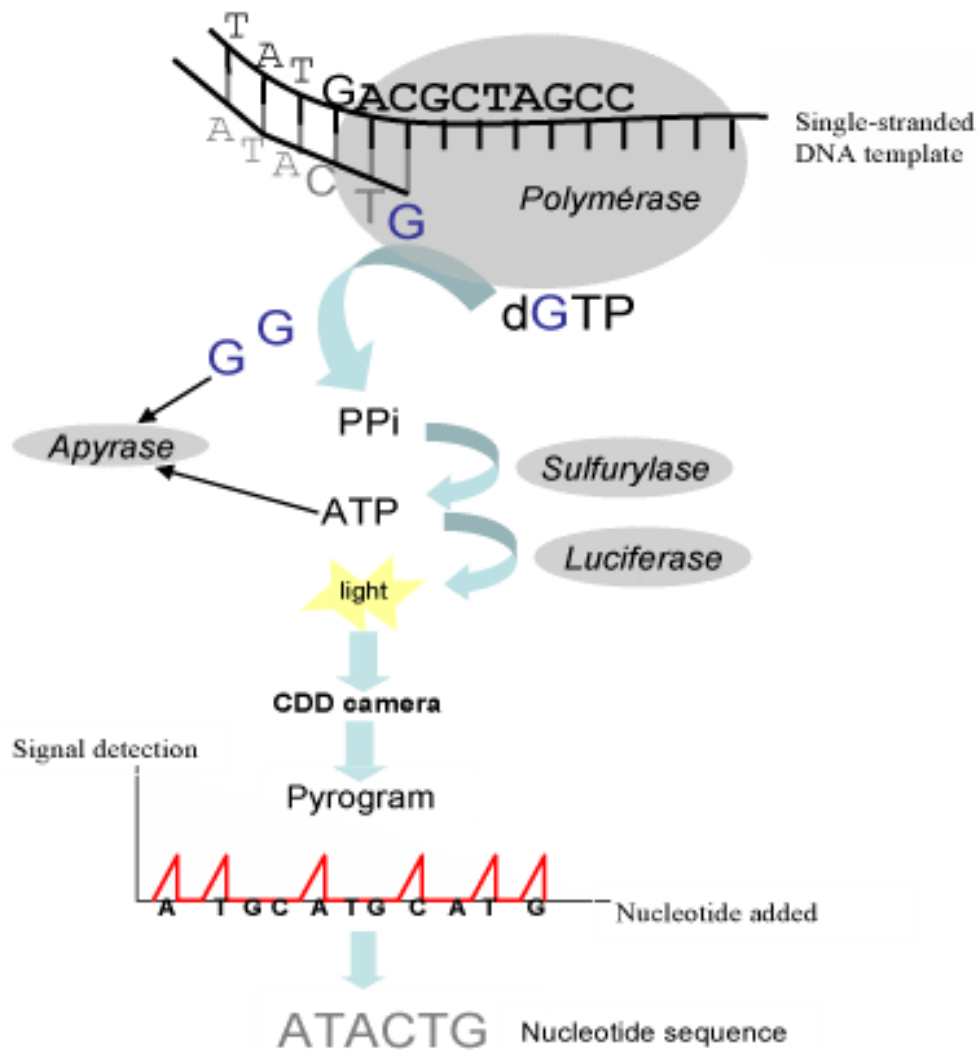
Masivně paralelní sekvenování

Sequencing by synthesis

The entire process is repeated four times, each time with the primer offset by 1 base

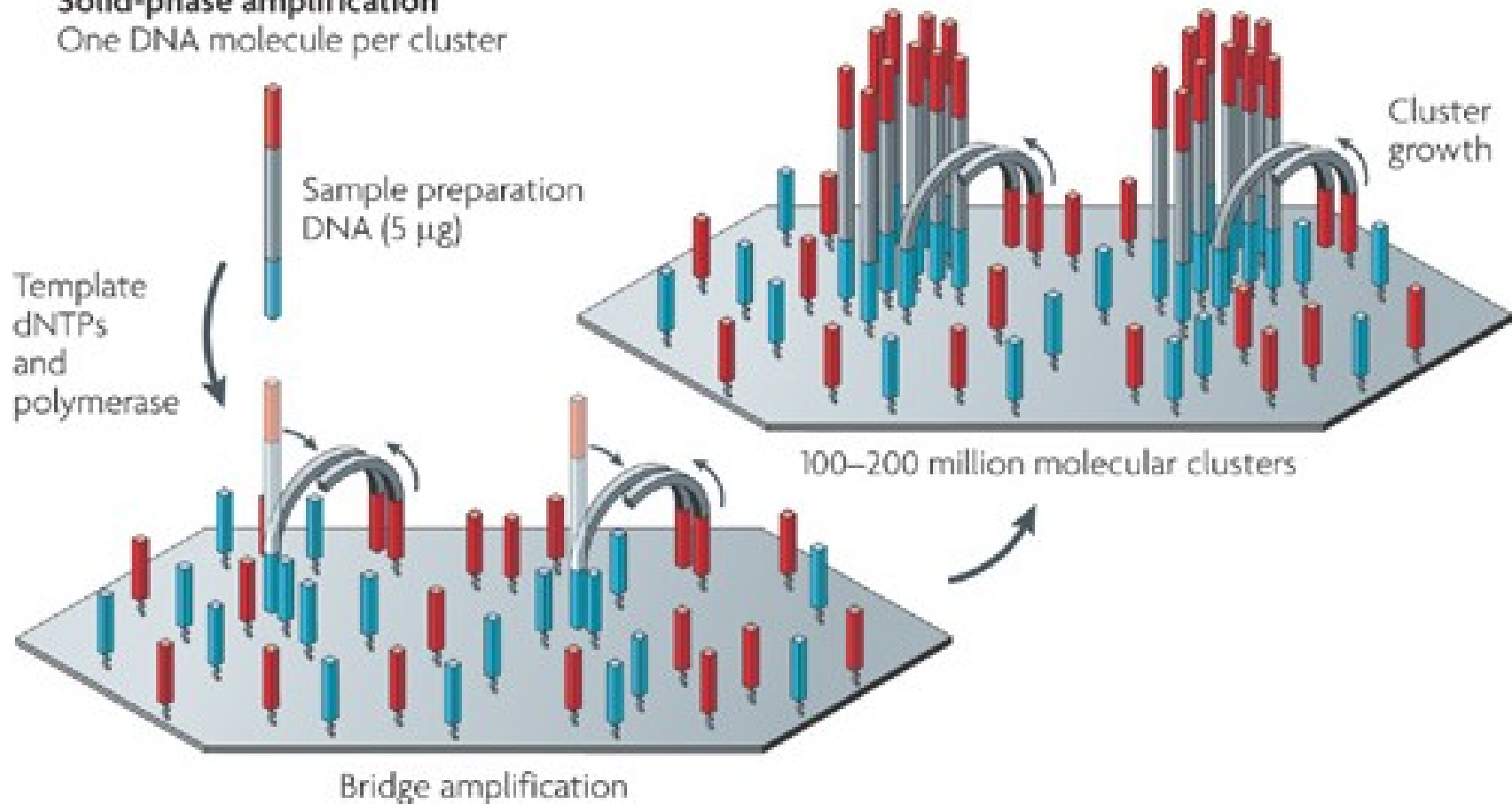


Pyrosekvenování



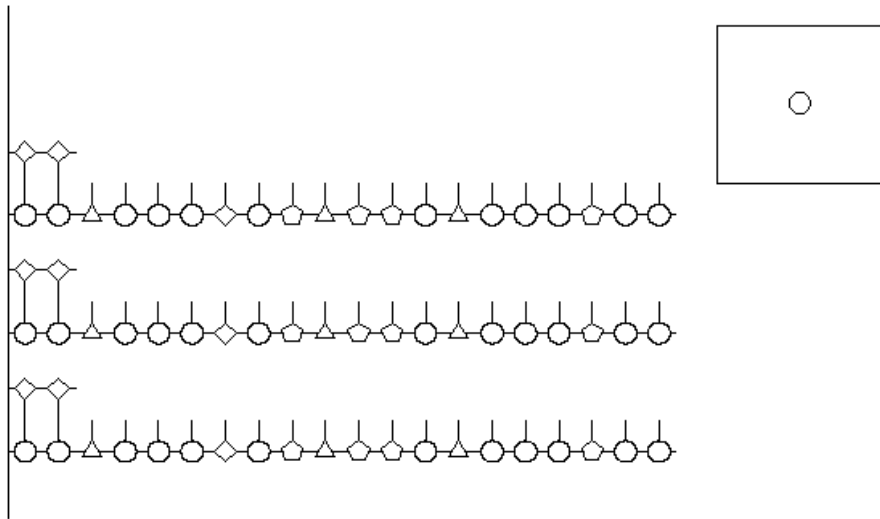
Bridge amplifikace

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



Masivně paralelní sekvenování

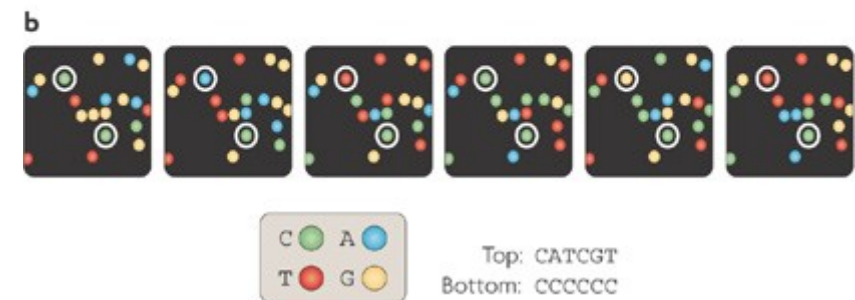
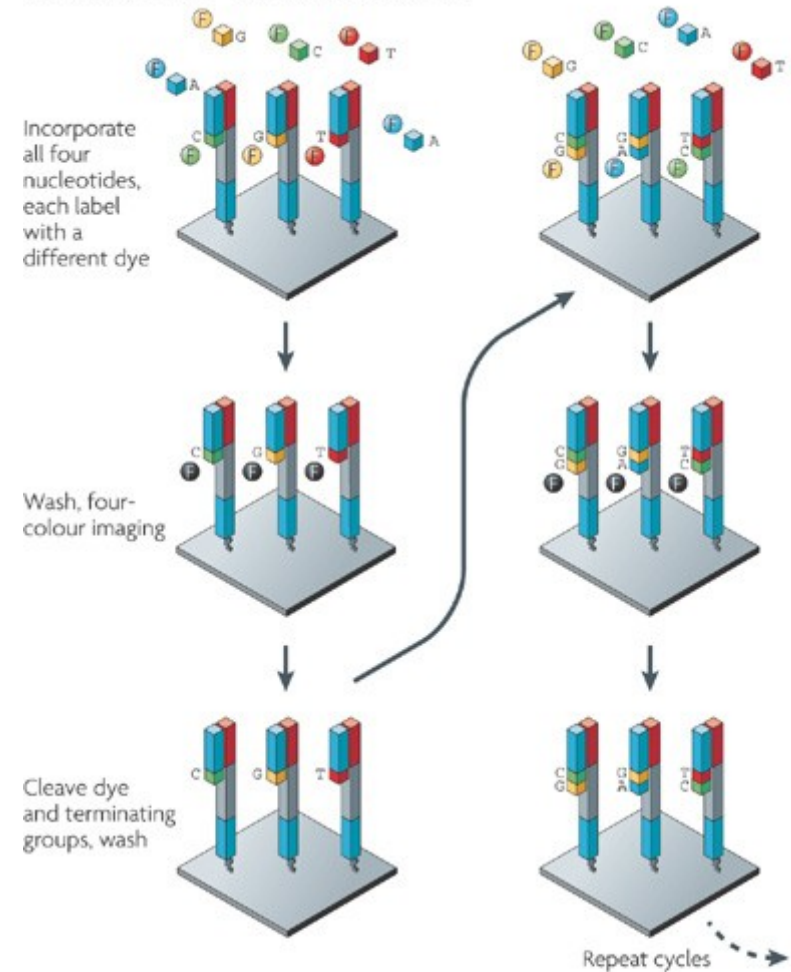
Sekvenování s reverzibilními terminátory



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

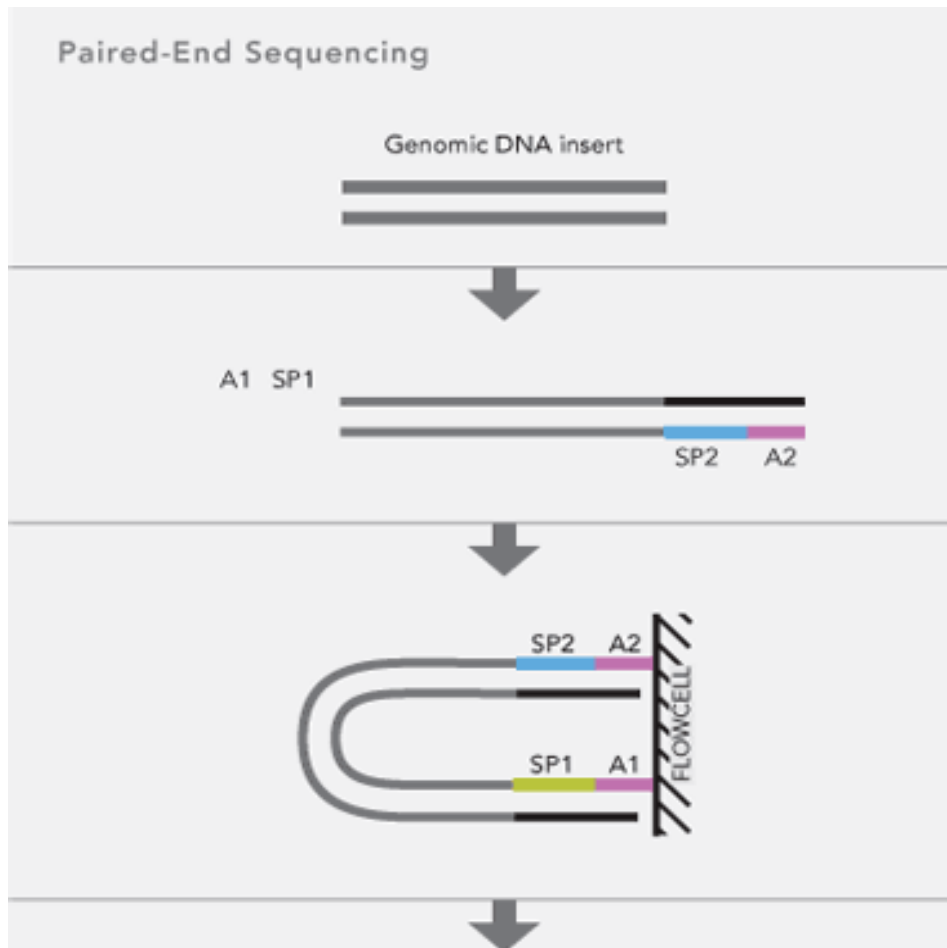
Technologie Illumina

a Illumina/Solexa — Reversible terminators

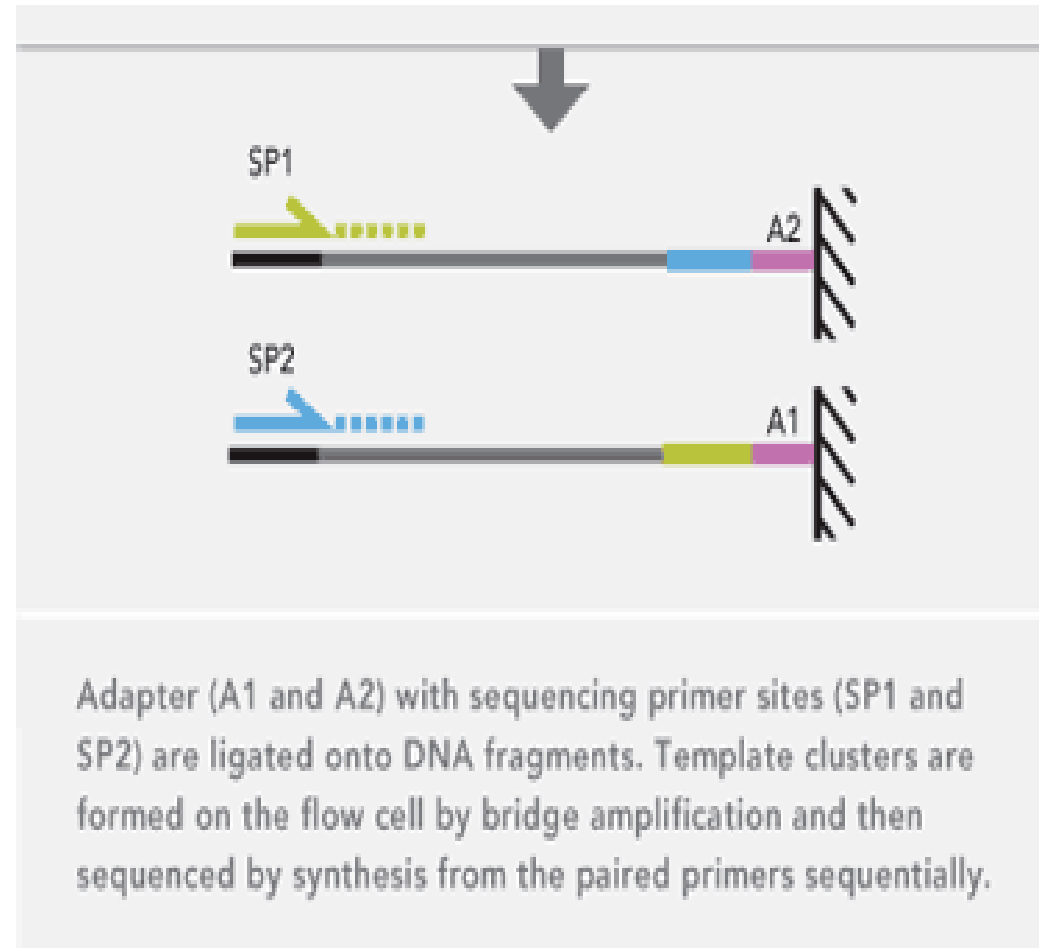


Masivně paralelní sekvenování

Paired-end sequencing

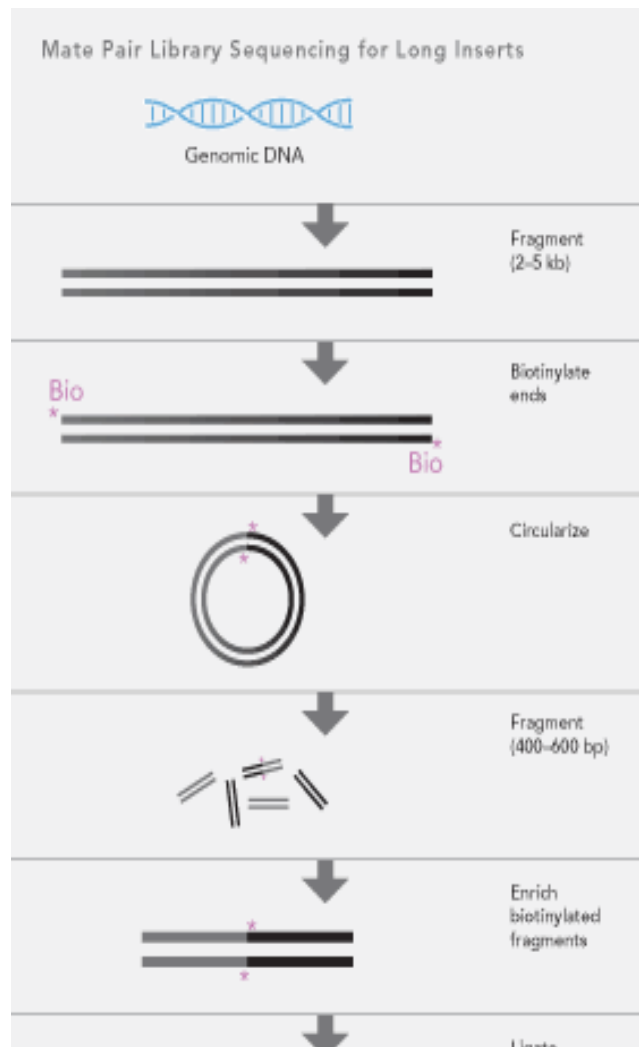


Illumina

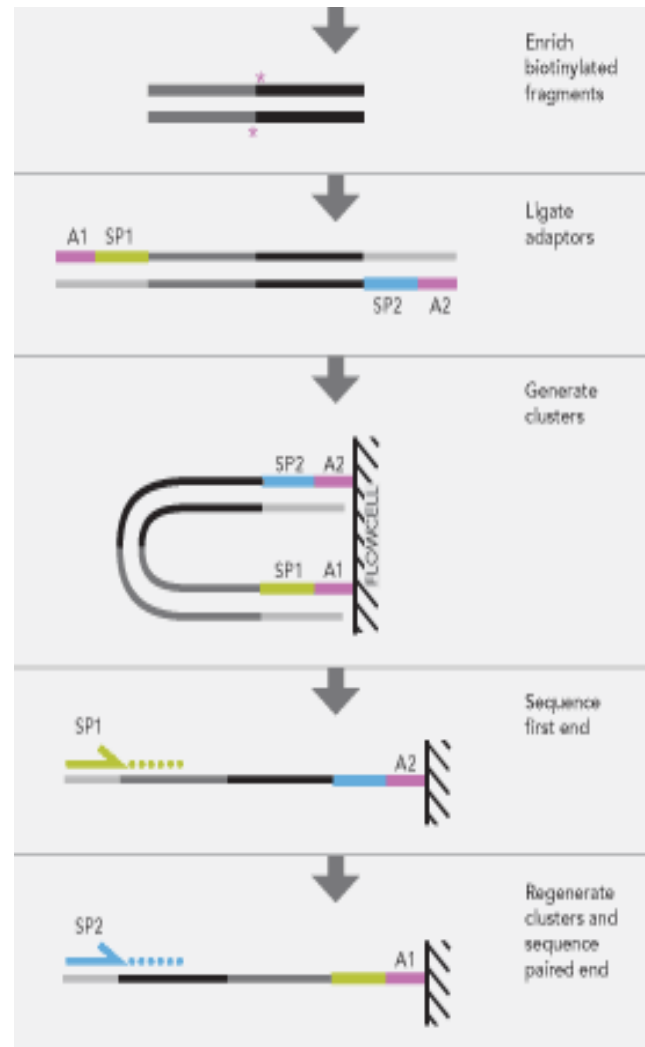


Masivně paralelní sekvenování

Mate-pair sequencing



Illumina



Mate Pair library preparation is designed to generate short fragments that consist of two segments that originally had a separation of several kilobases in the genome. Fragments of sample genomic DNA are end-biotinylated to tag the eventual mate pair segments. Self-circularization and refragmentation of these large fragments generates a population of small fragments, some of which contain both mate pair segments with no intervening sequence. These Mate Pair fragments are enriched using their biotin tag. Mate Pairs are sequenced using a similar two-adapter strategy as described for paired-end sequencing.

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

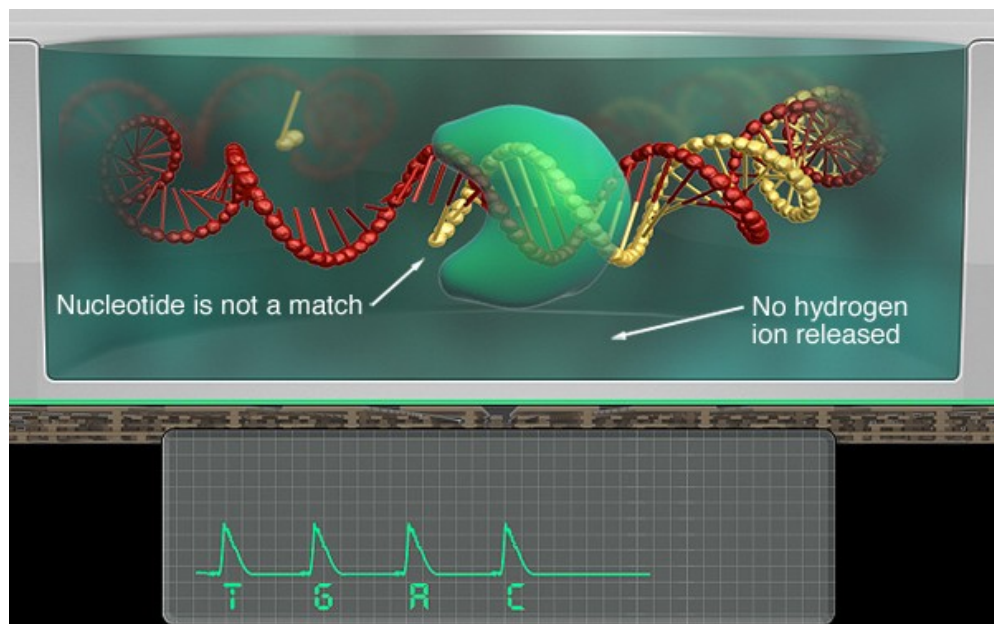
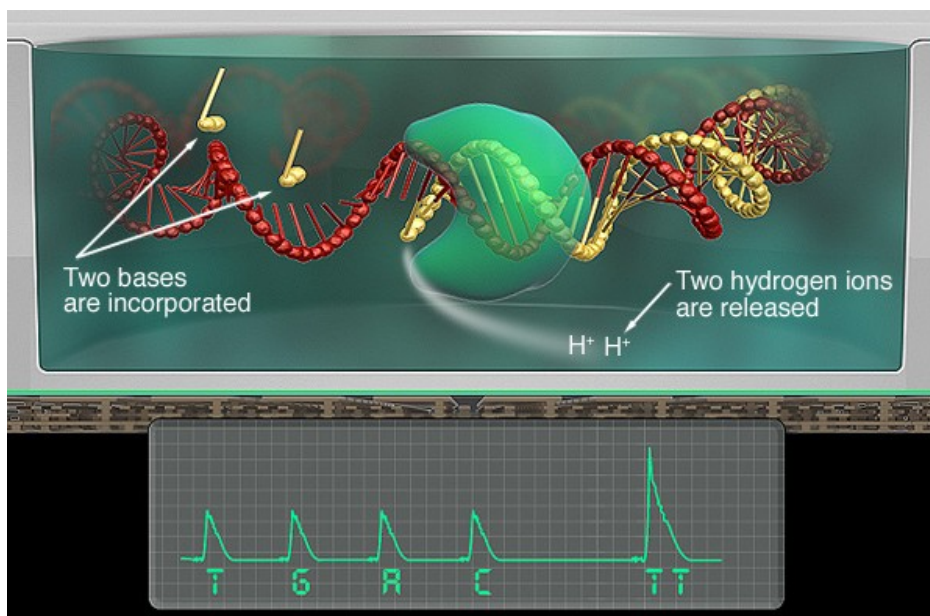
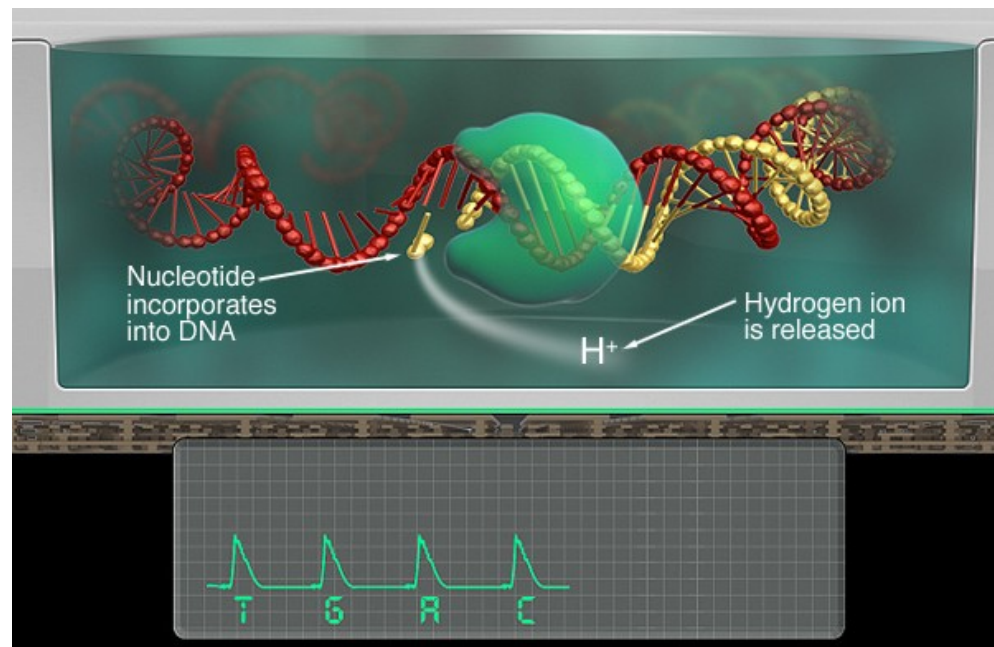
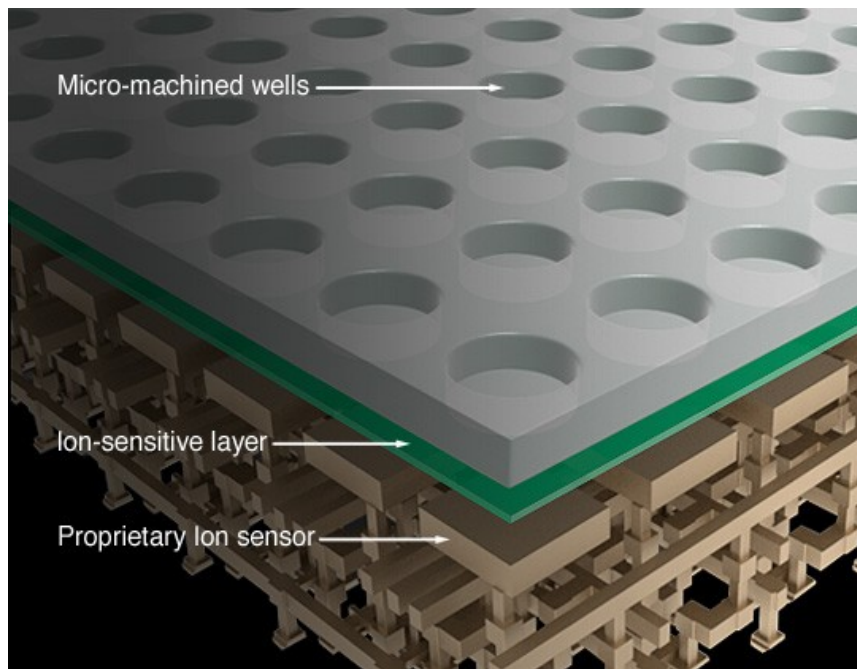


MiniSeq

Kapacita 0,07
genomu/běh, 7,5GB/běh

Masivně paralelní sekvenování

Technologie Ion Torrent



Masivně paralelní sekvenování

Technologie Ion Torrent



Ion Torrent PGM

Kapacita 2GB/běh



Ion Proton

Kapacita 10+GB/běh



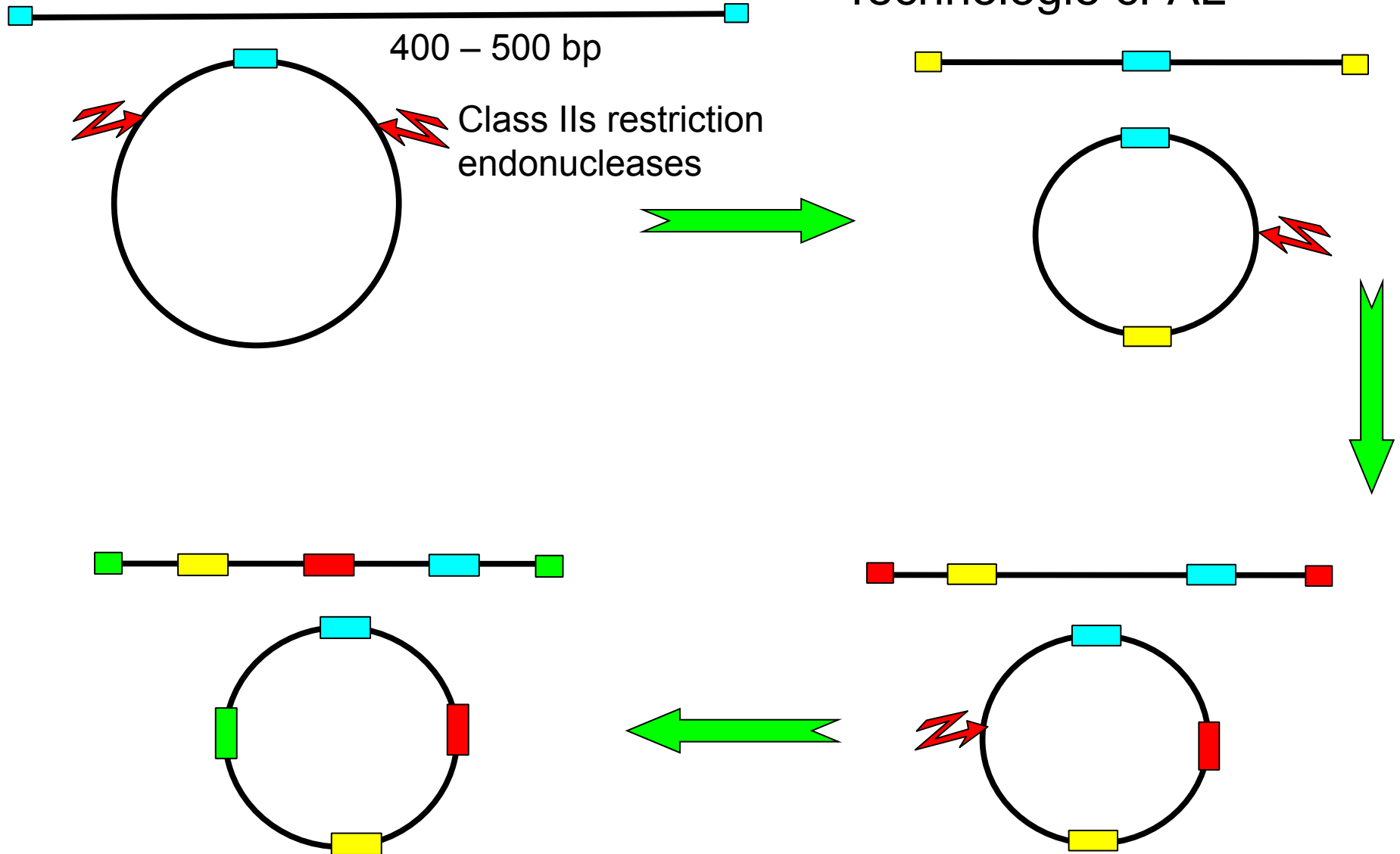
Ion S5

Kapacita 10+GB/běh

Masivně paralelní sekvenování

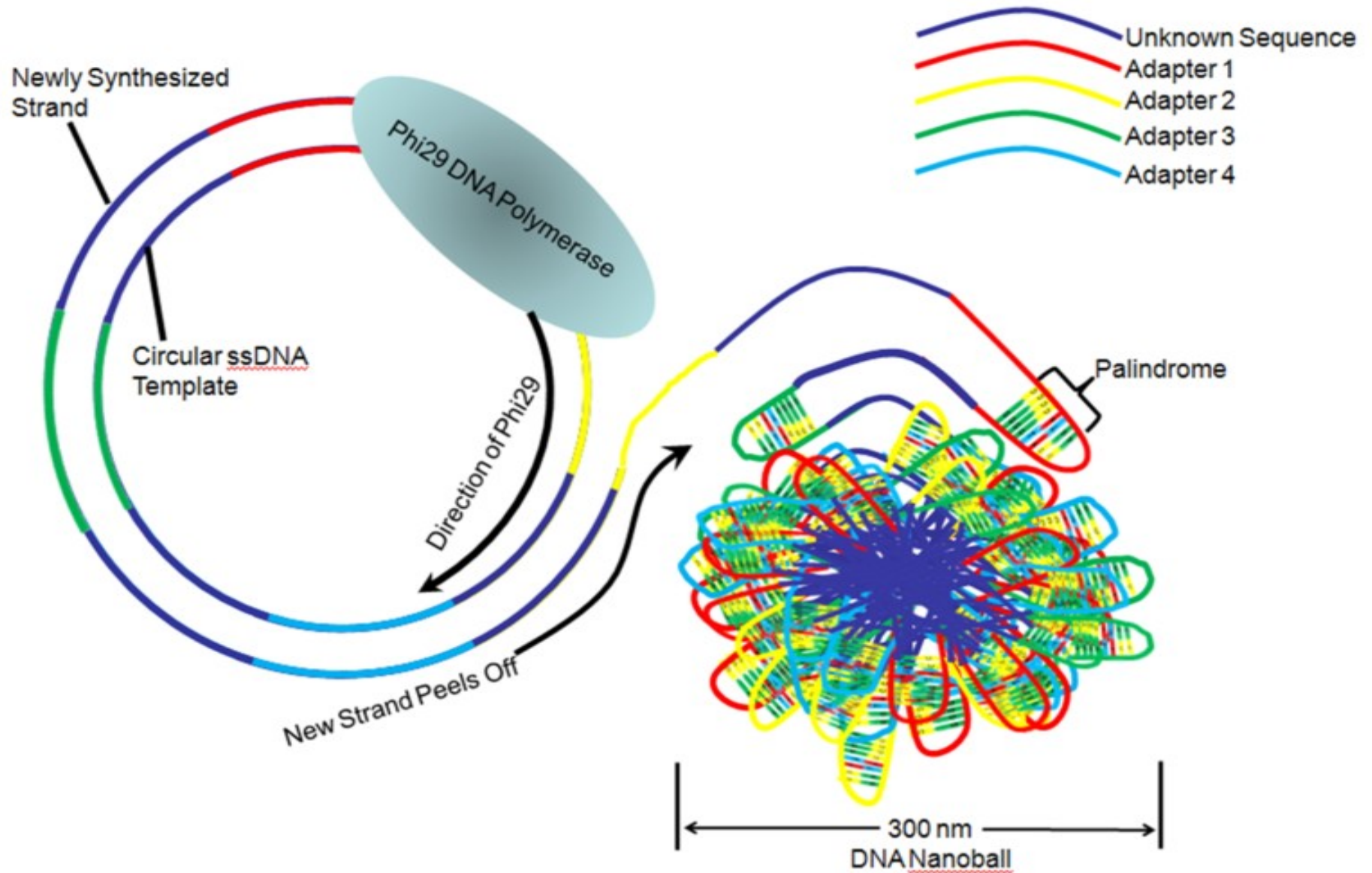
DNA nanoball sequencing

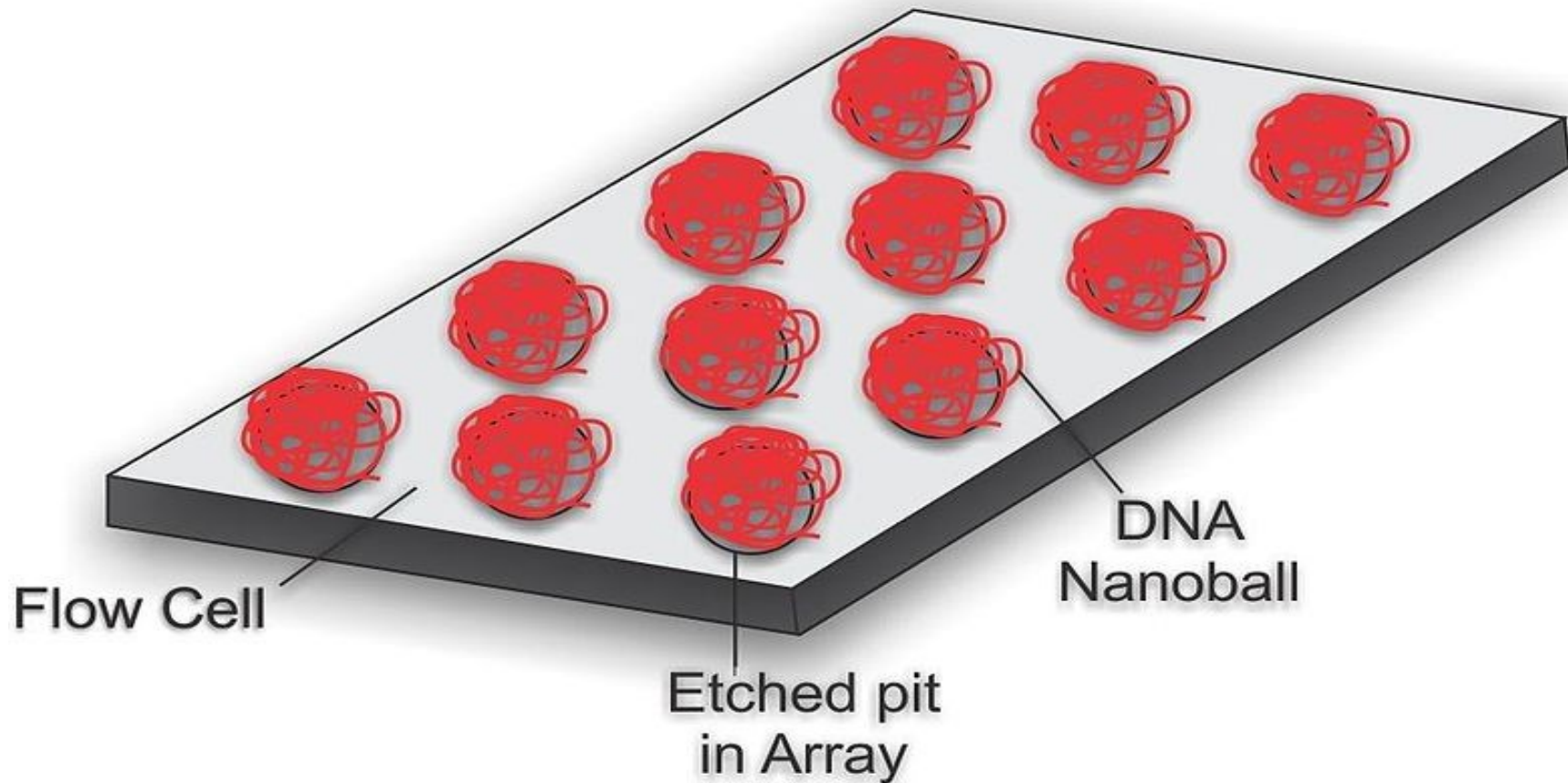
Technologie cPAL



Masivně paralelní sekvenování

Technologie cPAL

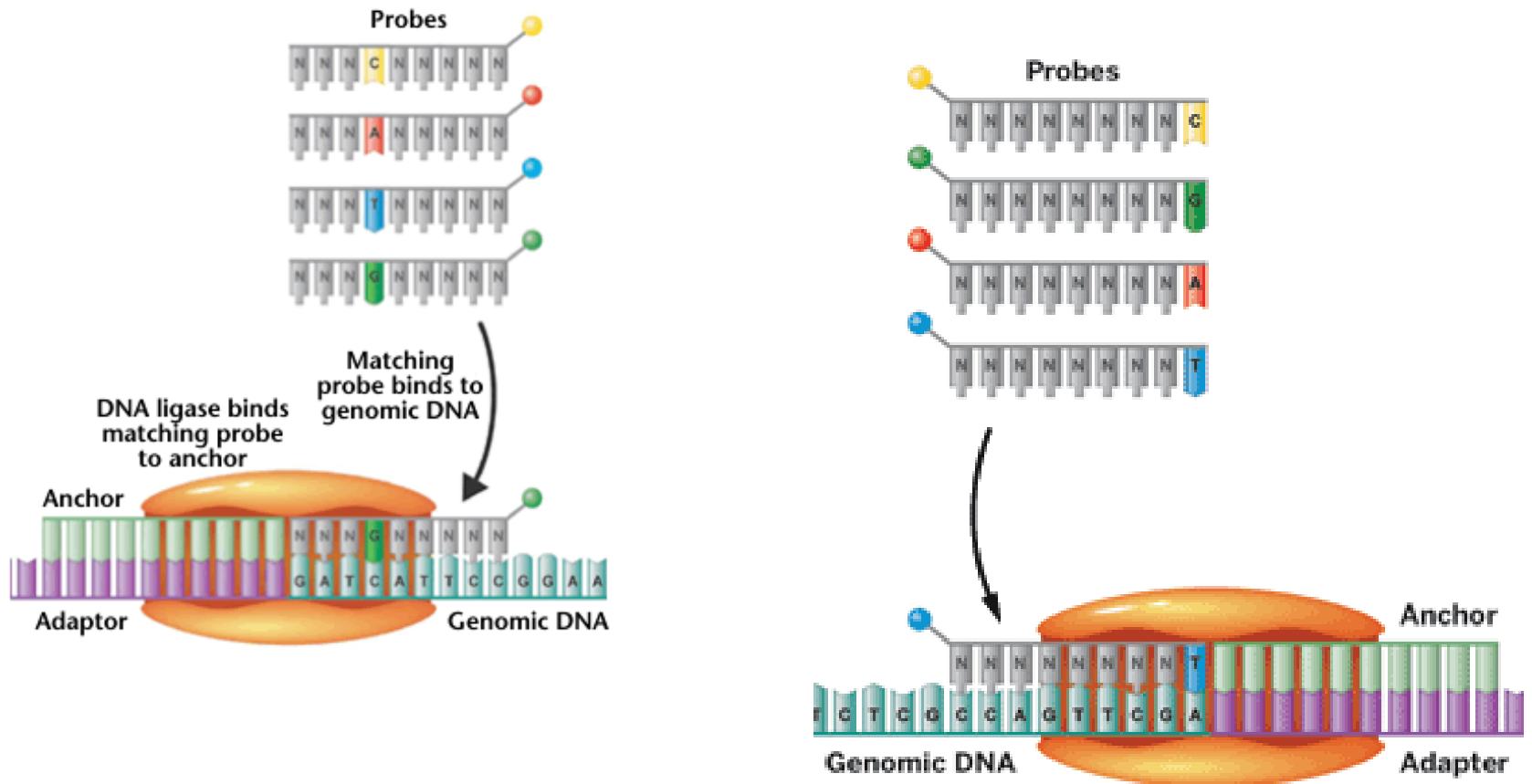




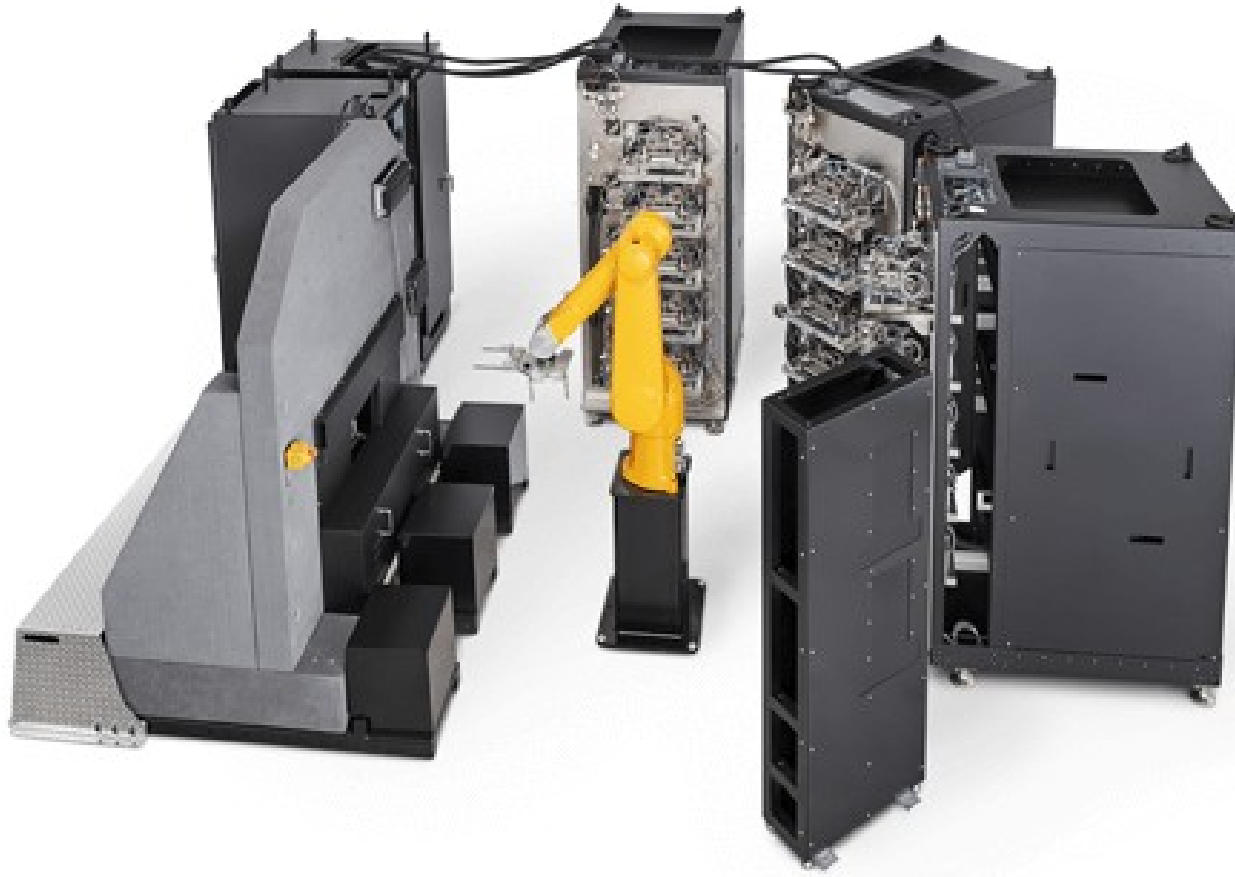
> 2,5 miliardy jamek na ploše velikosti podložního sklíčka (rozestup 0,7 mikrometru)

Masivně paralelní sekvenování

Sekvenování (hybridizací a) ligací



Up to 10 bases are sequenced on either side of each adaptor sequence.
A total of 70 bases from the original 500b fragment are sequenced, 35 bases on each end.



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



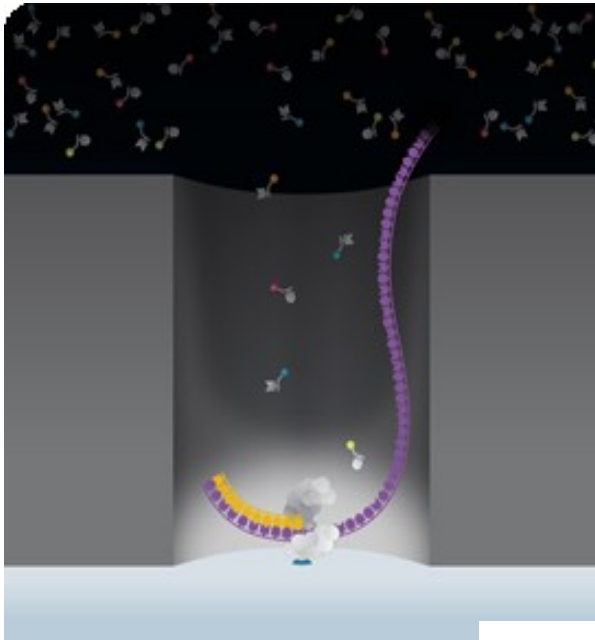
BGISEQ-50

Kapacita až ?GB

Masivně paralelní sekvenování 3. generace

Technologie SMRT

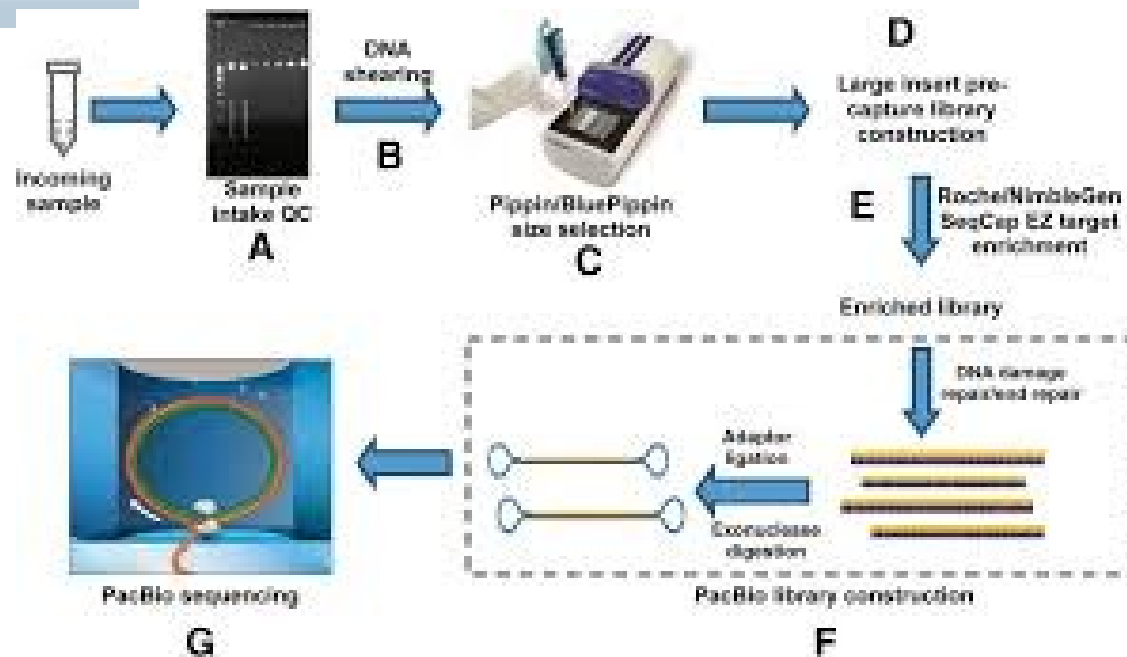
(Single Molecule Real Time)



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>



Masivně paralelní sekvenování

Oxford Nanopore



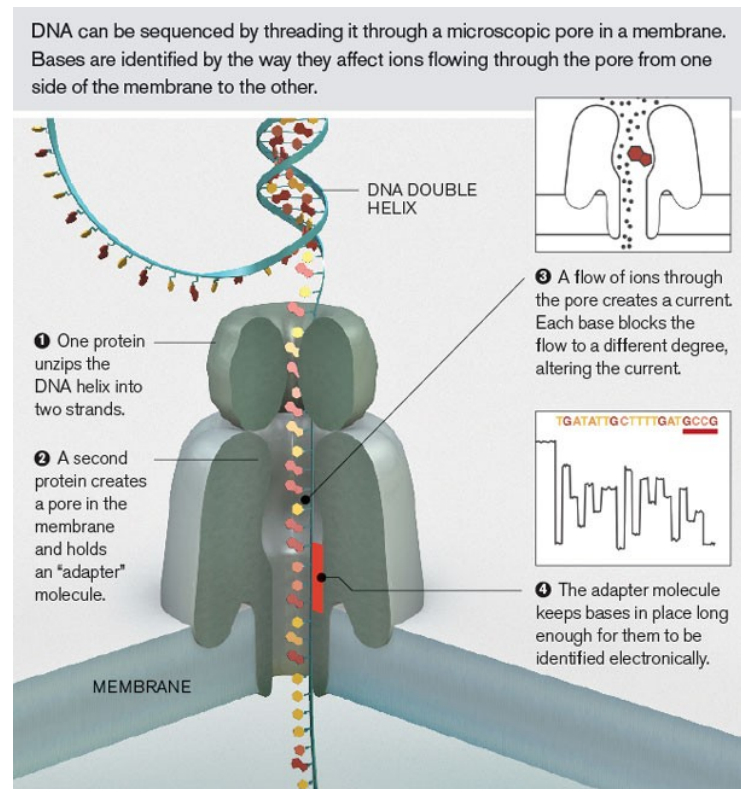
'Strand sequencing' is a technique that passes intact DNA polymers through a protein nanopore, sequencing in real-time as the DNA translocates the pore.

SmidgION
MinION
GridION
PromethION

<https://www.nanoporetech.com>

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

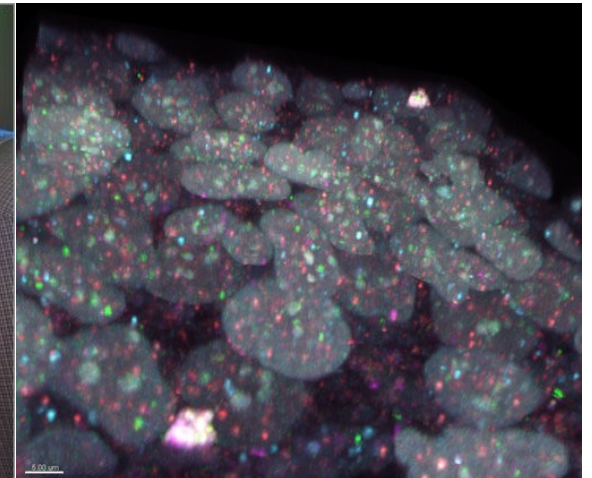
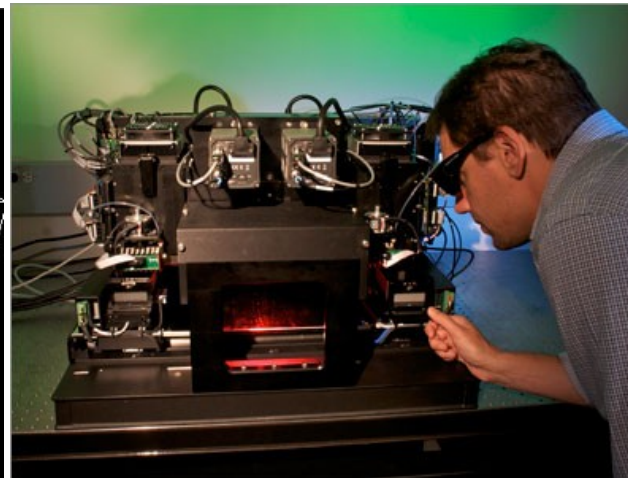
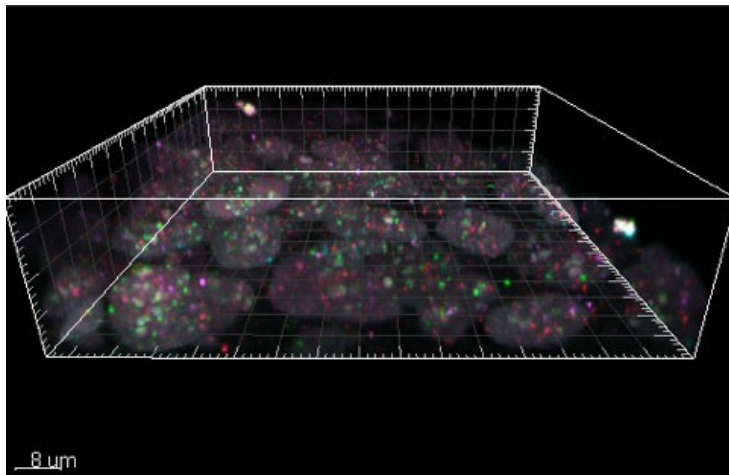
<https://www.youtube.com/watch?v=GUb1TZvMWsw>



Masivně paralelní sekvenování 4. generace???

ReadCooor

Fluorescent In Situ Sequencing



Aplikace nových technologií

Analýza DNA

Celogenomový screening

Sekvence

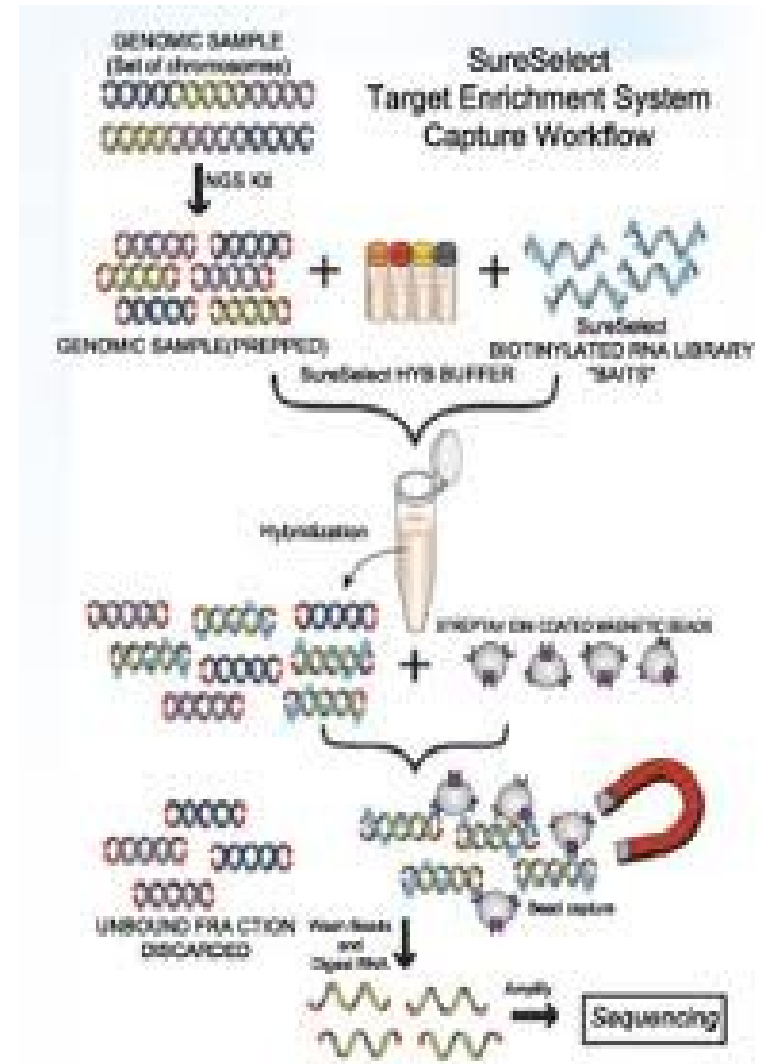
SNP

Strukturní aberace, početní aberace

Cílený screening

Sekvence

SNP



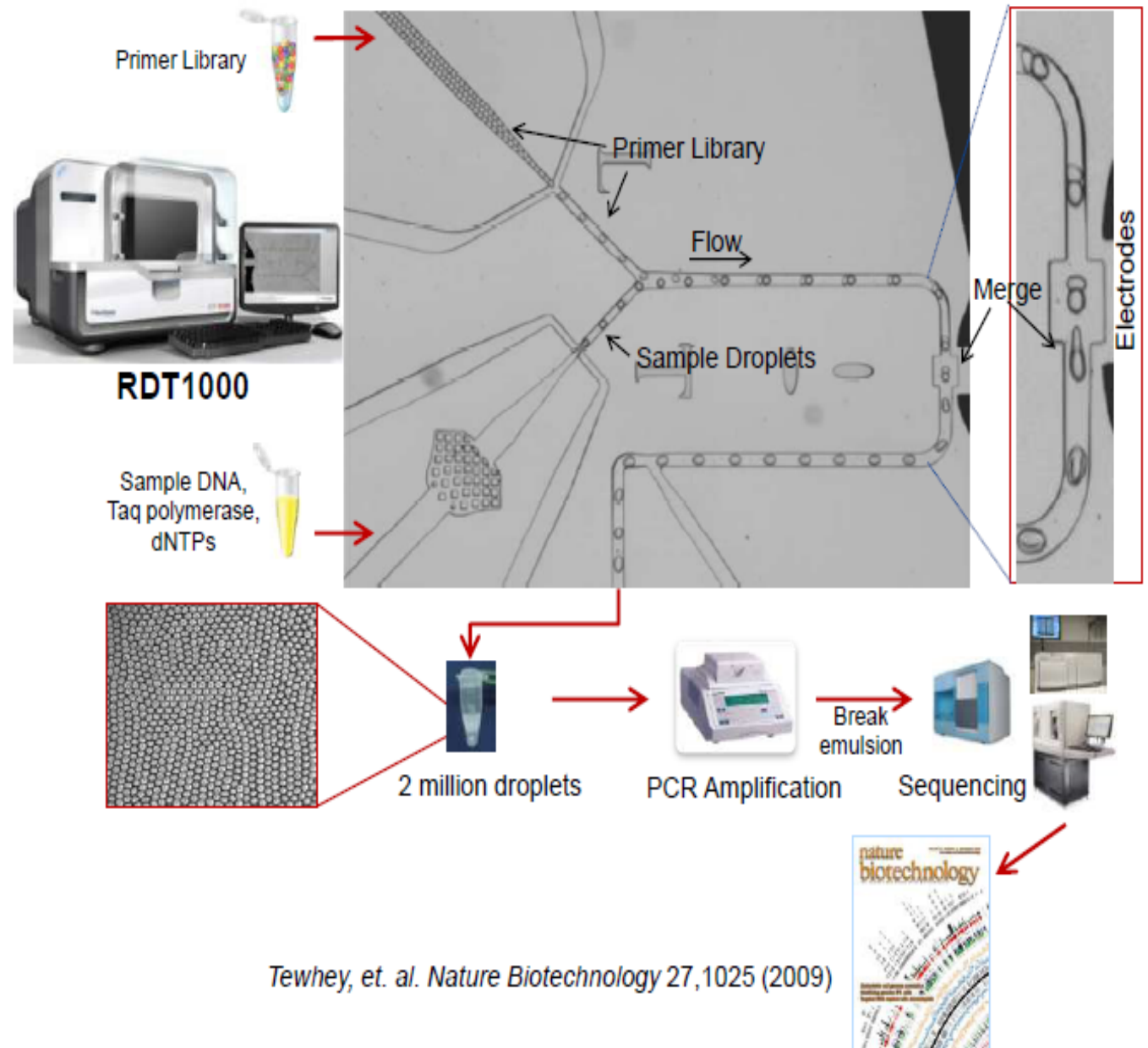
Cílený screening

Target enrichment

Hybridizace
na čipu
v roztoku

PCR
běžná
mikrofluidní

Targeted Sequencing Workflow Using the RDT1000



Cílený screening

Exome sequencing

Všechny exprimované geny

Většinou včetně nekódujících

Hybridizace (v roztoku)

Gene enrichment

Jeden gen – např. dědičné poruchy

PCR, hybridizace

multiplexing

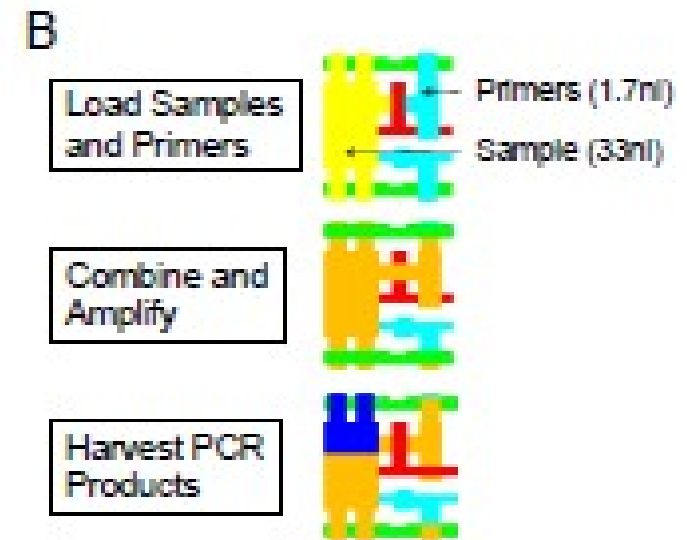
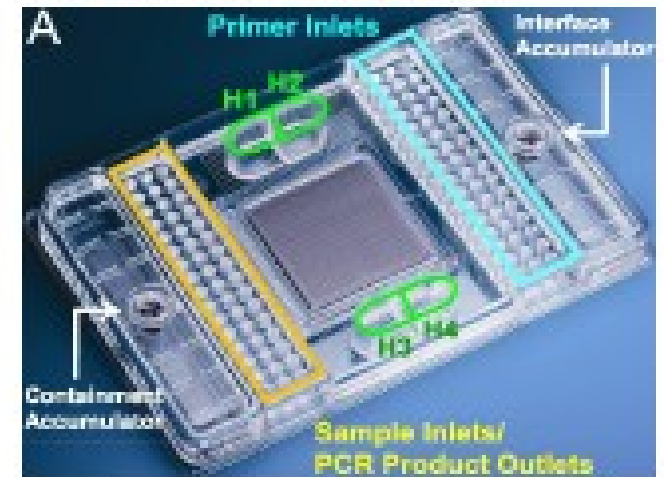
Skupiny genů – např. multifaktoriální nemoci, nádory

PCR, hybridizace

Úseky genomu – strukturní aberace

hybridizace

Figure 1: The Access Array System



RNA-Seq

Transcriptome sequencing

Single-end – kvantifikace

Paired-end – struktura transkriptů

Tag sequencing

3' tagy, kvantifikace, bez informace o struktuře

Degradome sequencing

5' tagy, identifikace cílů microRNA

Small RNA sequencing

MicroRNA kvantifikace i de-novo identifikace

Imunoprecipitace, RNA vázající proteiny

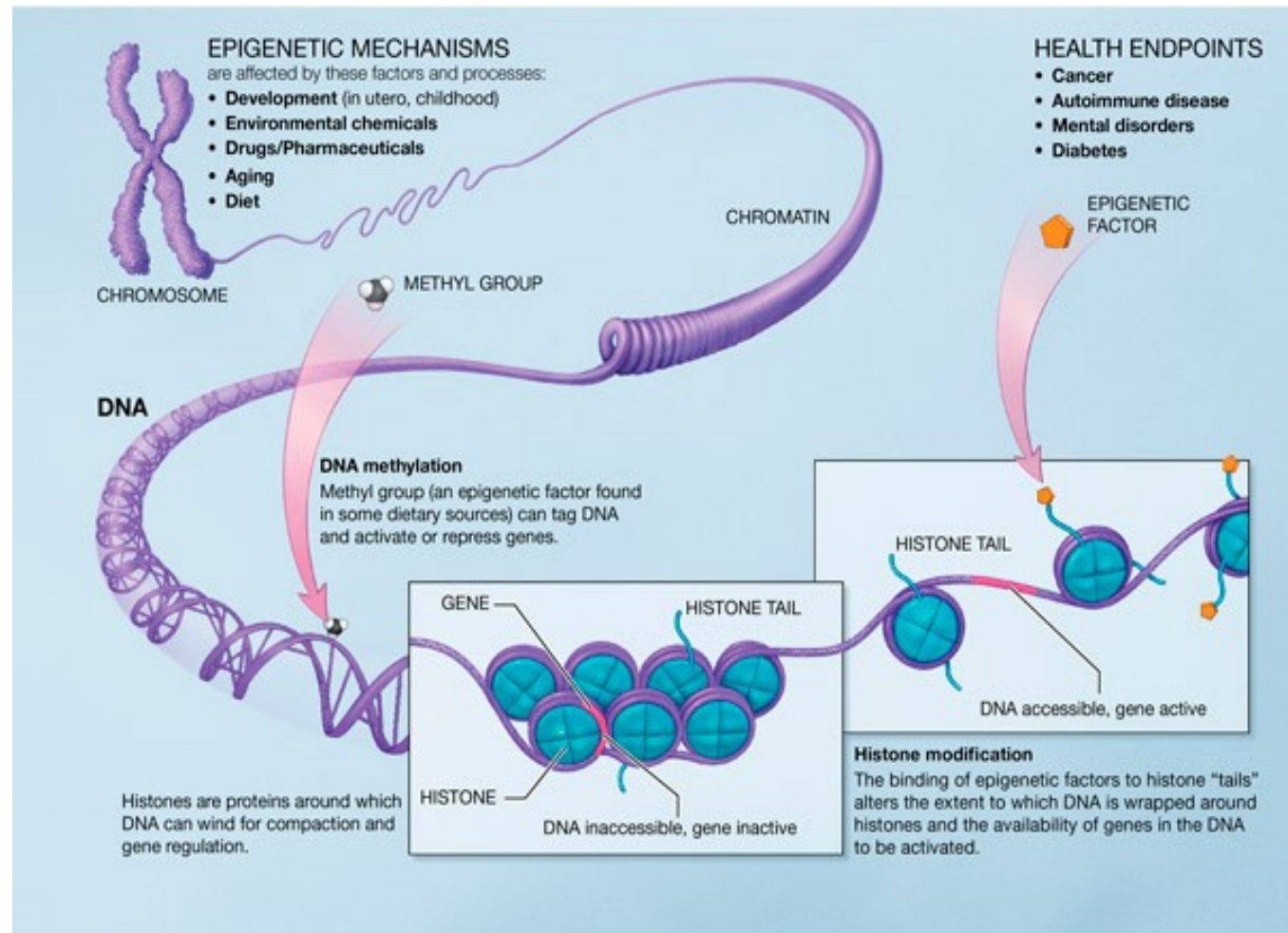
Epigenomika

DNA metylace

C → Met-C, snížená exprese

Modifikace histonů

Aktivní I neaktivní chromatin



Metylace DNA

MeDIP - Imunoprecipitace metylované DNA

Protilátka rozpoznávající Met-C

Pozice metylovaných úseků DNA

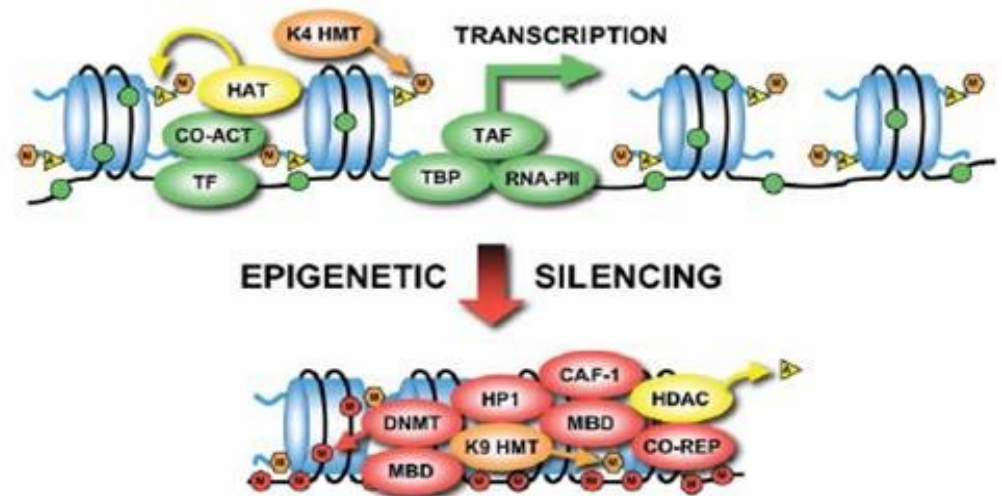
Bisulfite treatment

Konverze C → U, Met-C se nemění

Přesná identifikace jednotlivých metylovaných bazí

Některé dědičné choroby, nádory

Human Molecular Genetics, 2005, Vol. 14, Review Issue 1



Analýza NGS dat

Quality Control

Assembling – vytvoření kontigů

De-novo

Mapování na referenční sekvenci

Identifikace variant

SNP (SNV)

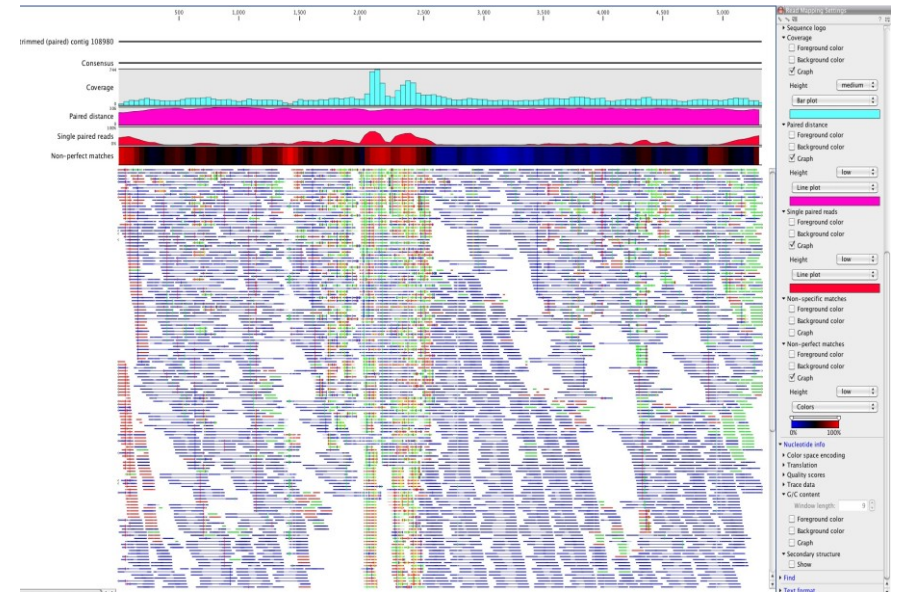
In/del

Strukturní aberace – chromosomy, transkripty

Kvantifikace

DNA – amplifikace/delece, místa vazby transkripčních faktorů

RNA – tagy, exony, transkripty



NGS projekty

TCGA – The Cancer Genome Atlas

ICGC – International Cancer Genome Consortium

Genomics England – 100000 Genomes (25000 cancer)

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

