



Středoevropský technologický institut
BRNO | ČESKÁ REPUBLIKA

Masivně paralelní sekvenování

Boris Tichý

Sdílená laboratoř Genomika

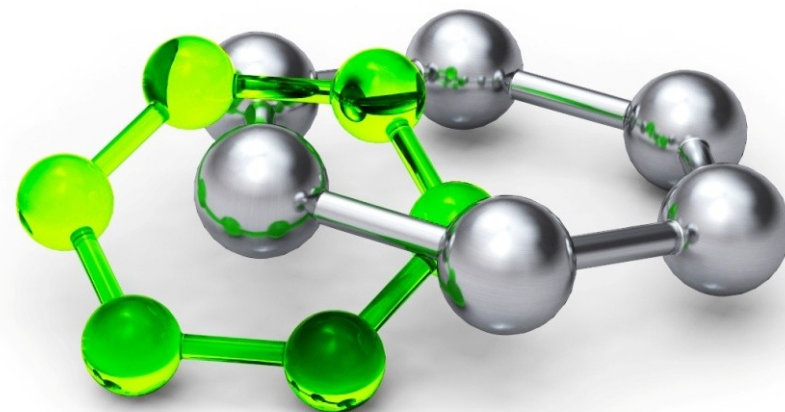
Brno, 17.10.2022



EVROPSKÁ UNIE
EVROPSKÝ FOND PRO REGIONÁLNÍ ROZVOJ
INVESTICE DO VAŠÍ BUDOUCNOSTI



OP Výzkum a vývoj
pro inovace

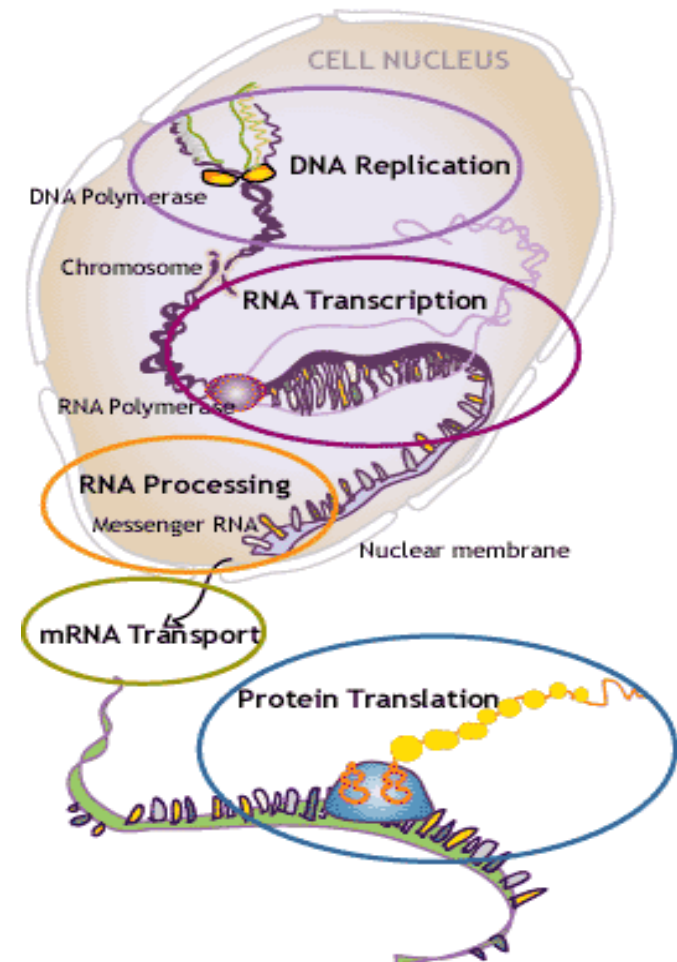
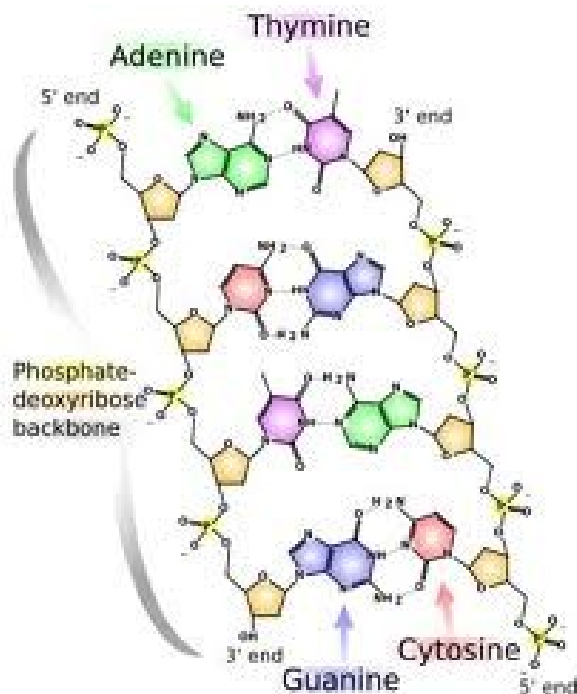


Informace je uložena v DNA

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

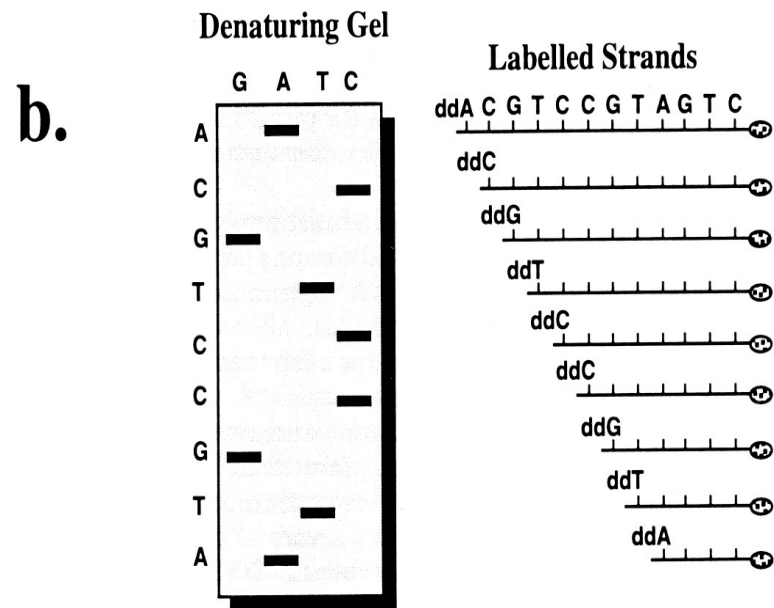
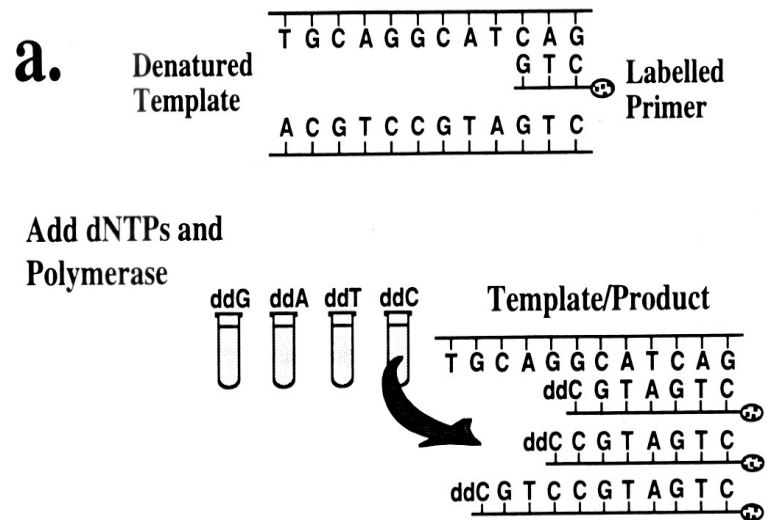
V každé lidské buňce je ~ 3 miliardy bazí = ~ 3 metry = ~ 6.6 pikogramů

Sekvence DNA je v každé buňce stejná



Sekvenování DNA

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

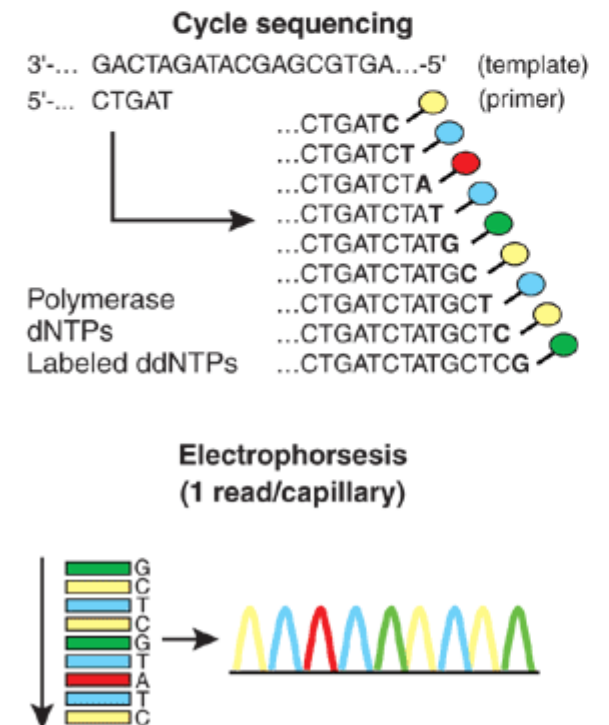


Vytvoření různě dlouhých fragmentů DNA

Dideoxy-NTPs → ukončení polymerace

Gel → kapilární elektroforéza

Značené primery nebo ddNTPs



Masivně paralelní sekvenování

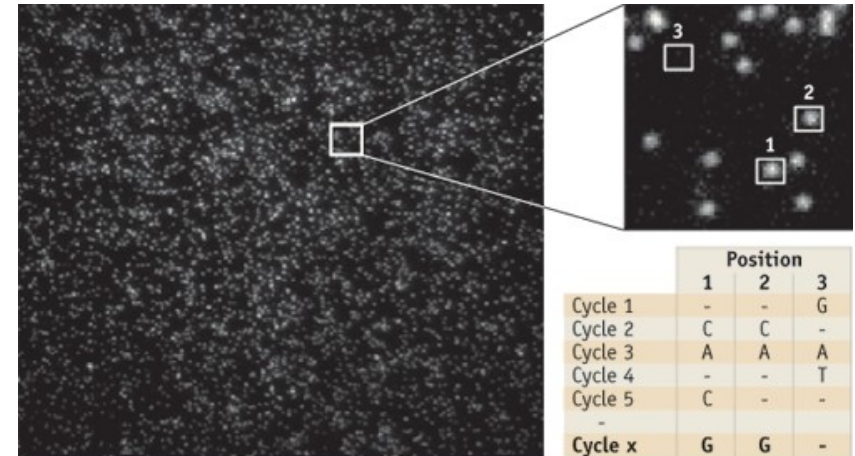
PCR amplifikace jednotlivých DNA fragmentů a sekvenování

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

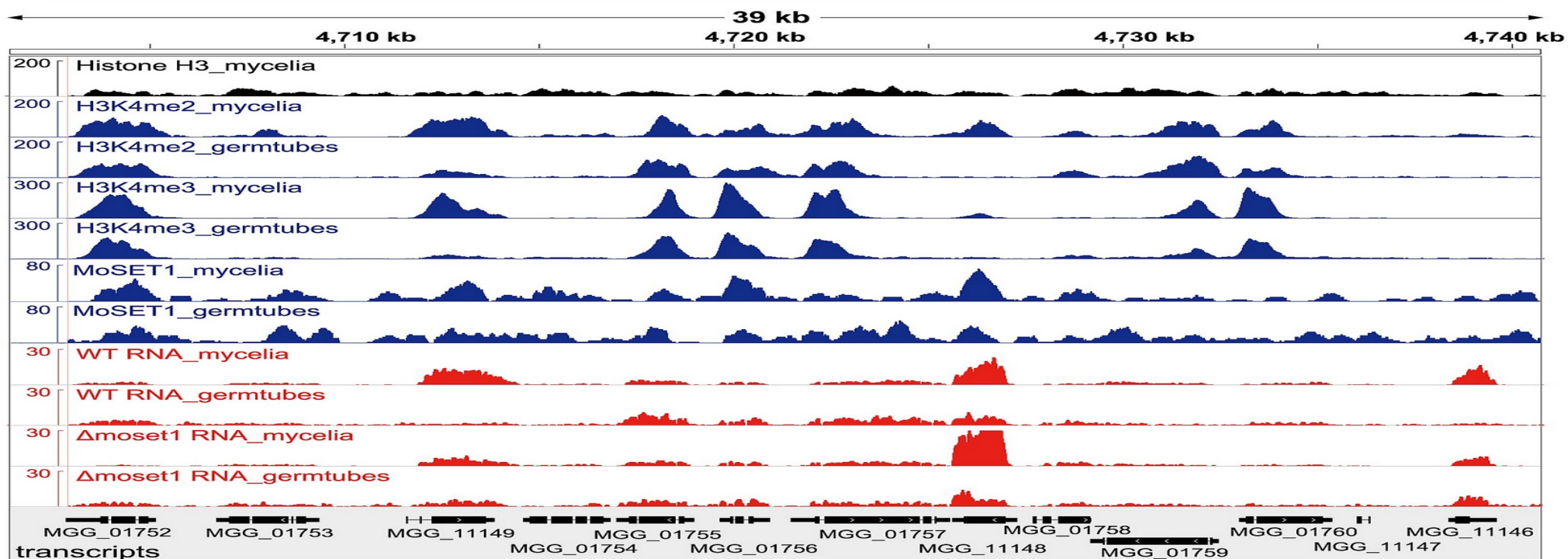
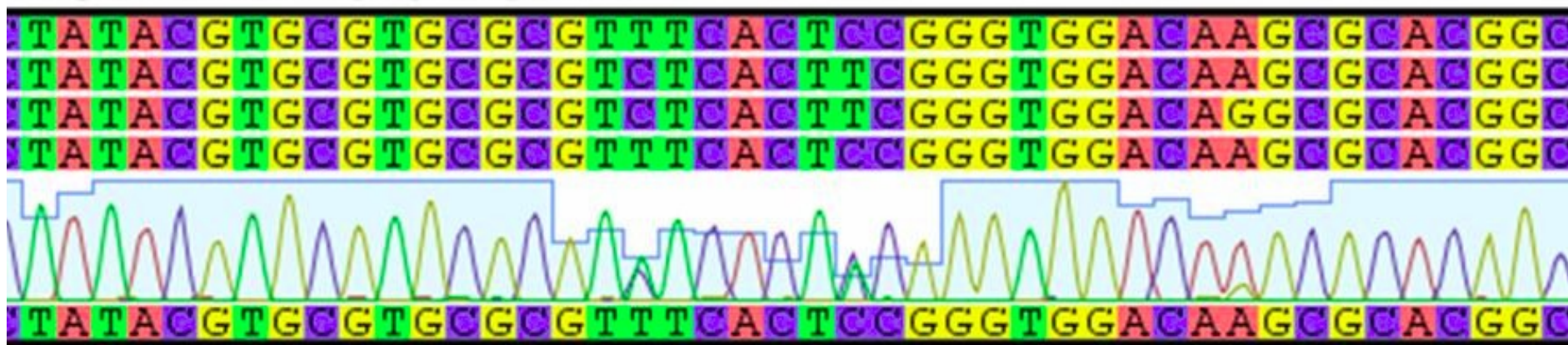
(běžně prodávané kapilární sekvenátory jsou max. 96-kapilární)

Většinou kratší sekvence – desítky bazí

(kapilární – běžně až 1000 bazí)

Sekvenování DNA

Single nucleotide polymorphisms

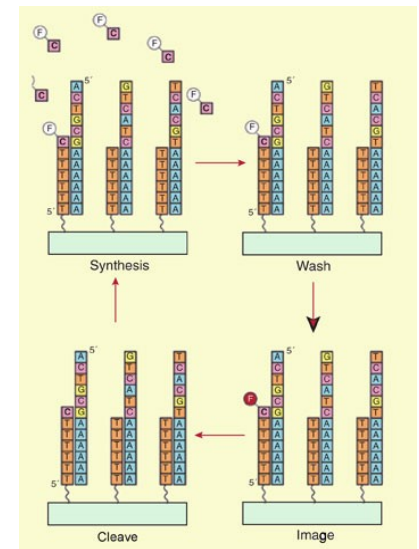


Masivně paralelní sekvenování

Sequencing by synthesis

Polymeráza

Sestavování nového řetězce z jednotlivých nukleotidů

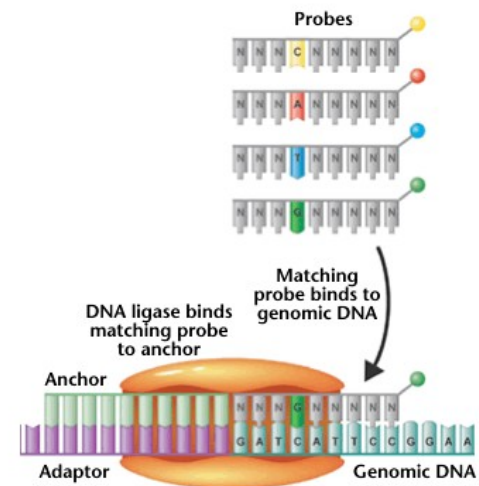


Sequencing by binding

Sequencing by ligation

Ligáza

Sestavování nového řetězce z oligonukleotidů

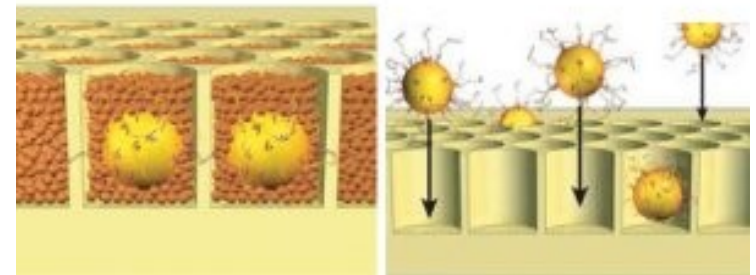
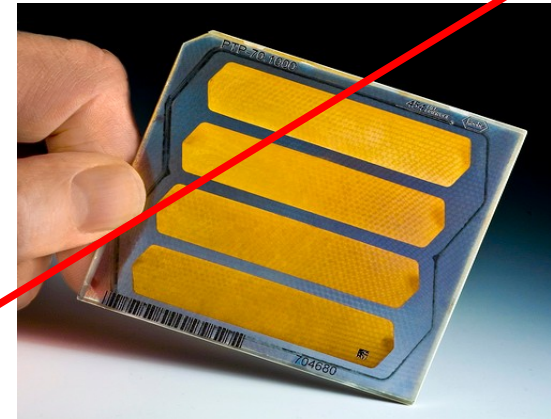
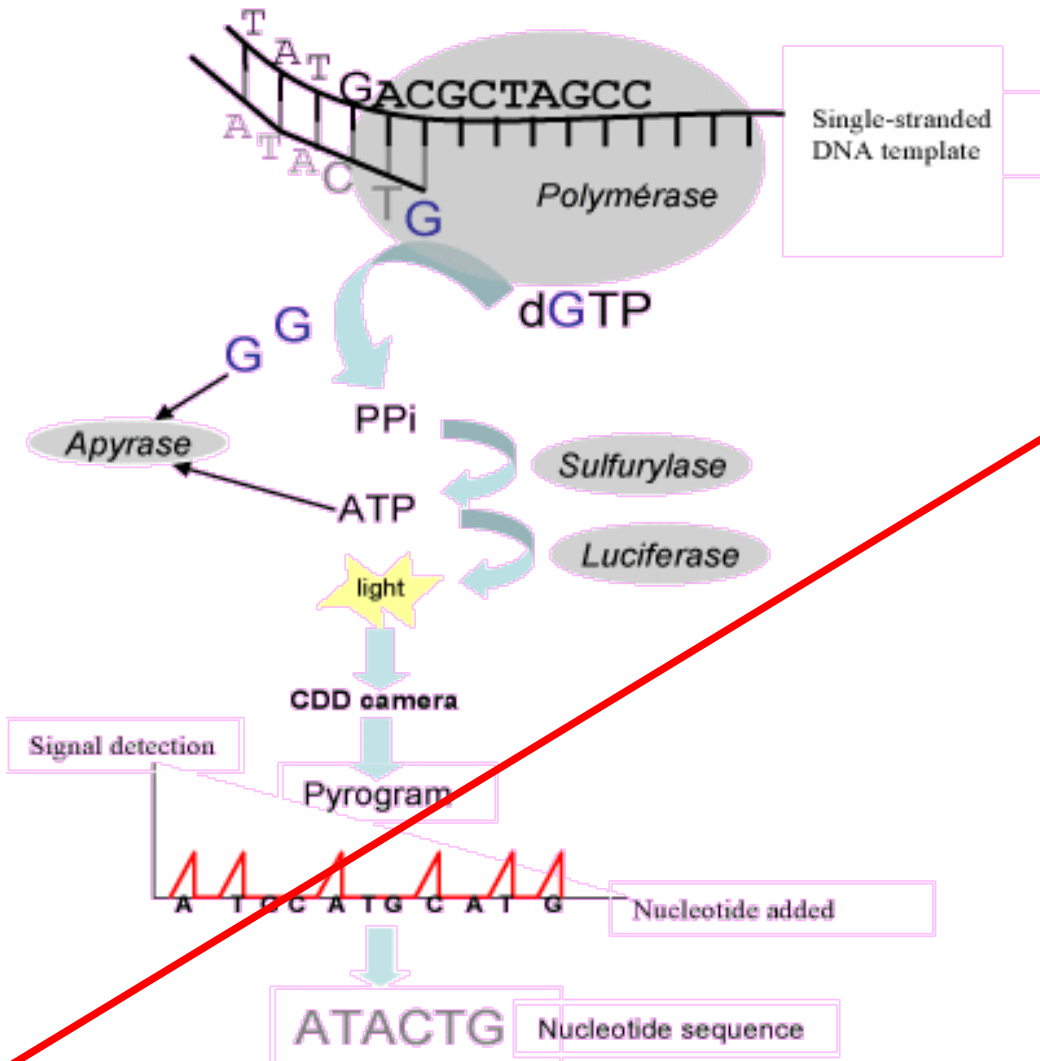


Non-enzymatic sequencing

Nanopory, elektronová mikroskopie

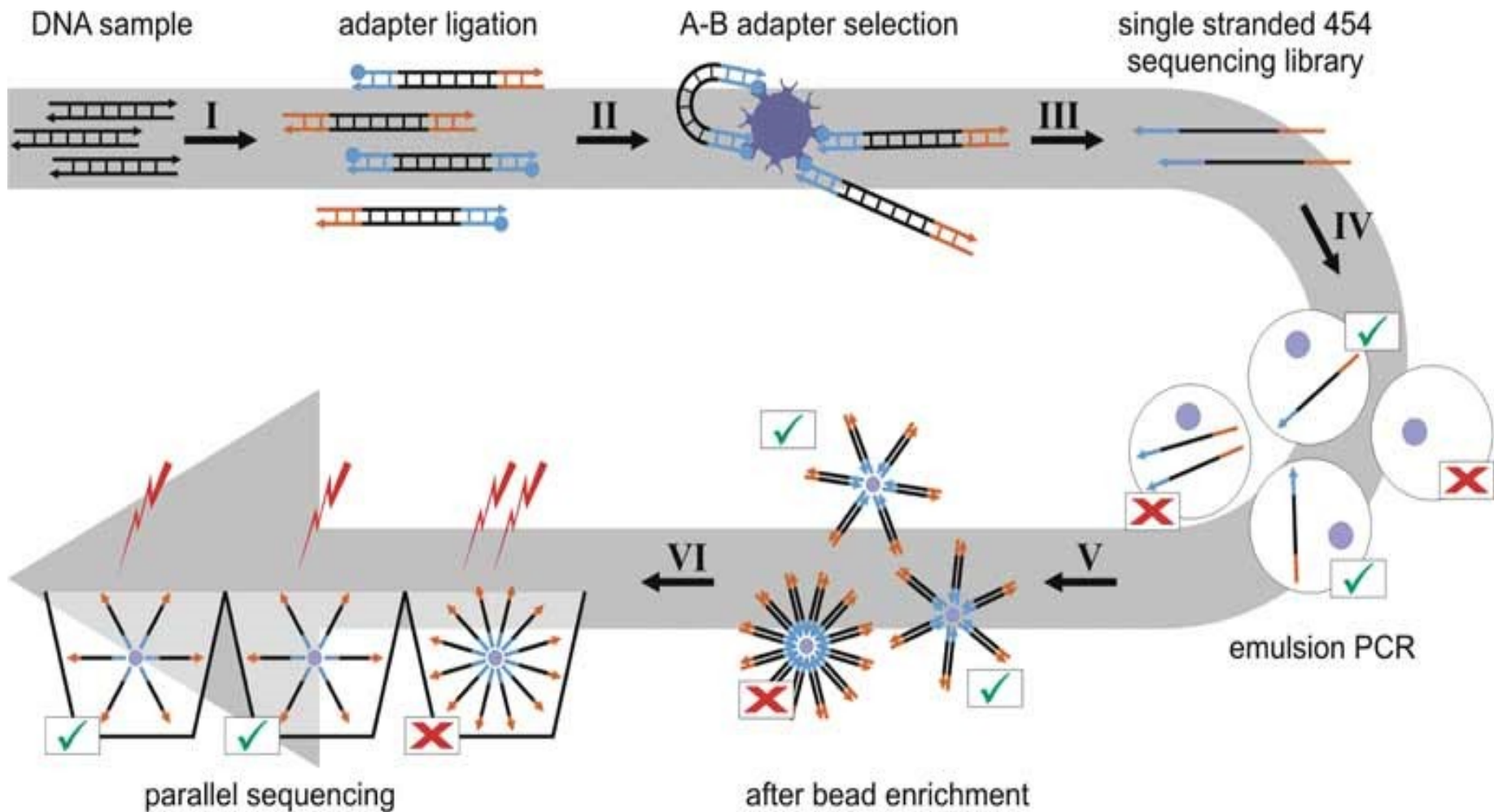
Přímé čtení sekvence

Pyrosekvenování



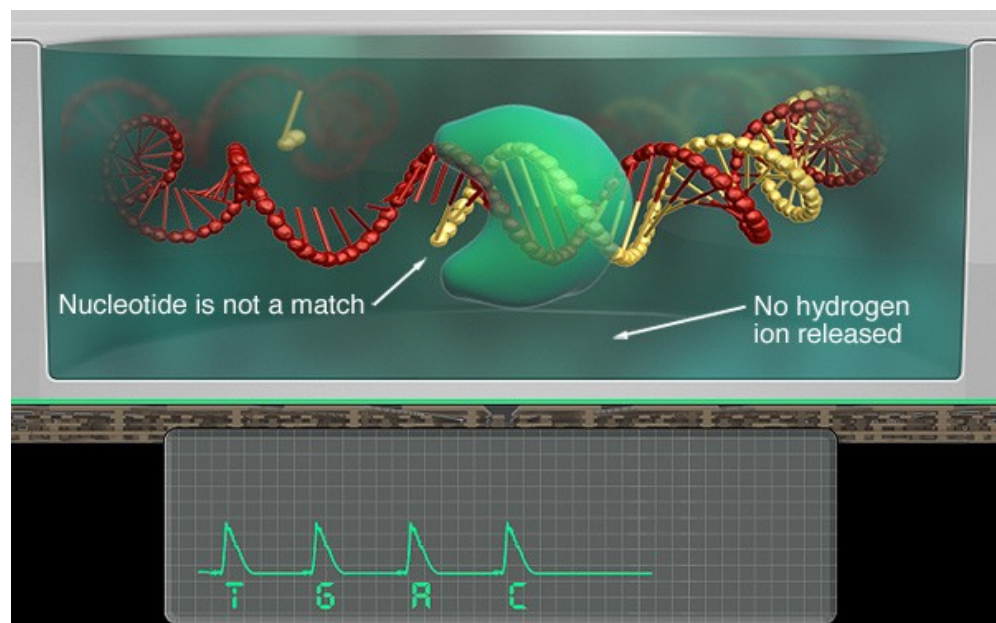
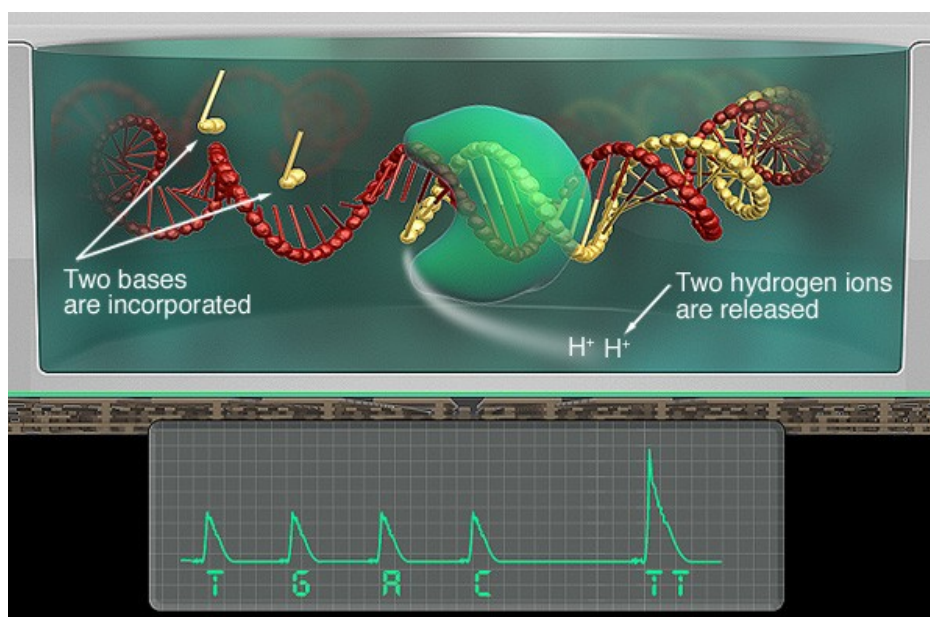
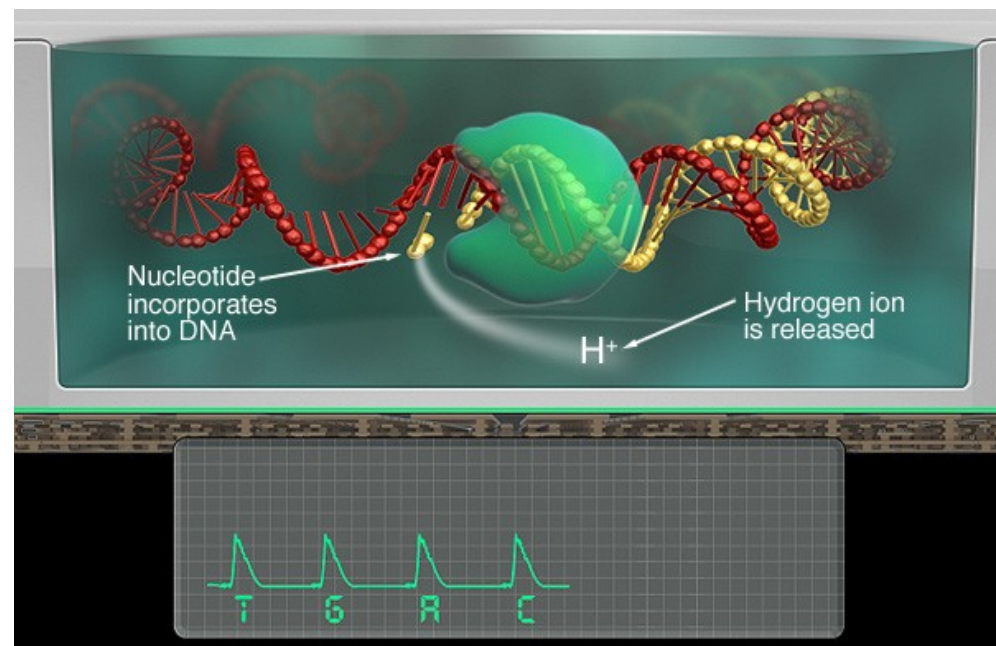
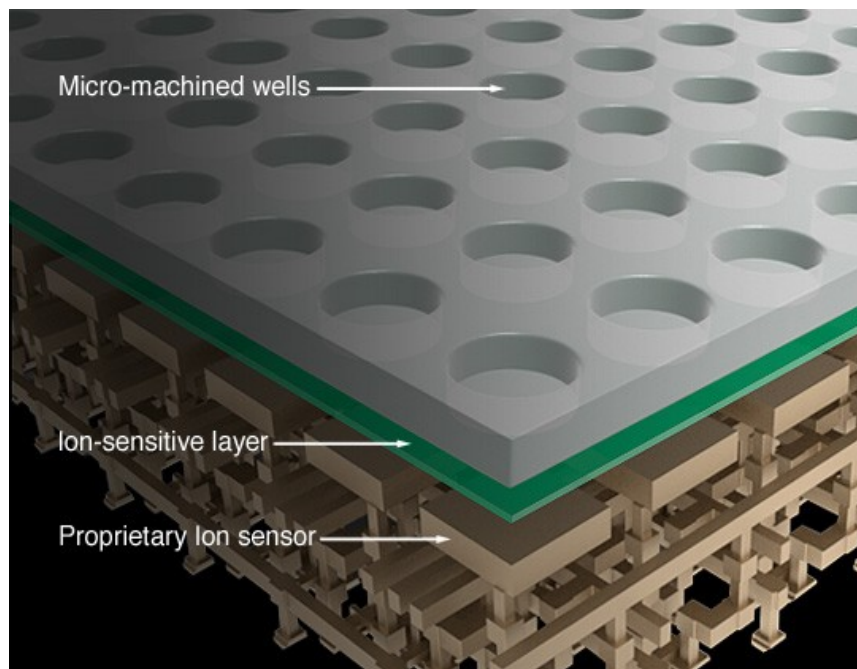
<https://www.youtube.com/watch?v=bFNjxKHP8Jc>
https://www.youtube.com/watch?v=hL--H_u649A

Emulzní PCR



Masivně paralelní sekvenování

Technologie Ion Torrent



Masivně paralelní sekvenování

Technologie Ion Torrent



Ion Torrent PGM

Kapacita 2GB/běh



Ion Proton

Kapacita 10+GB/běh



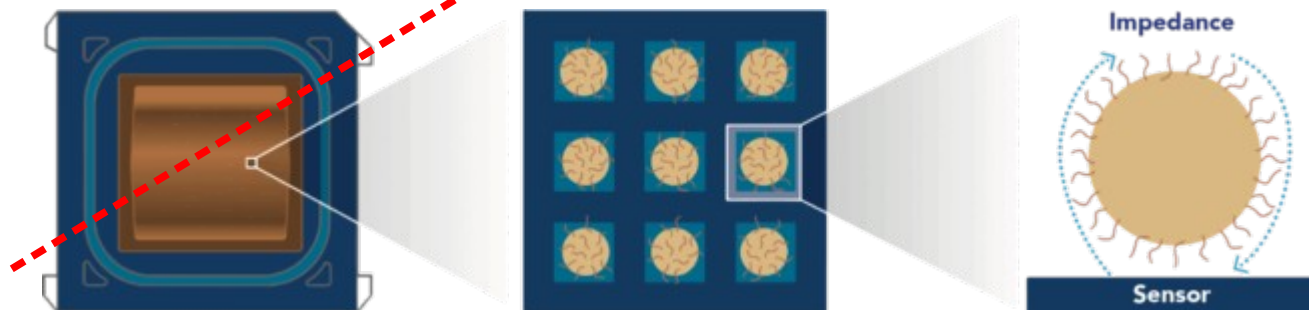
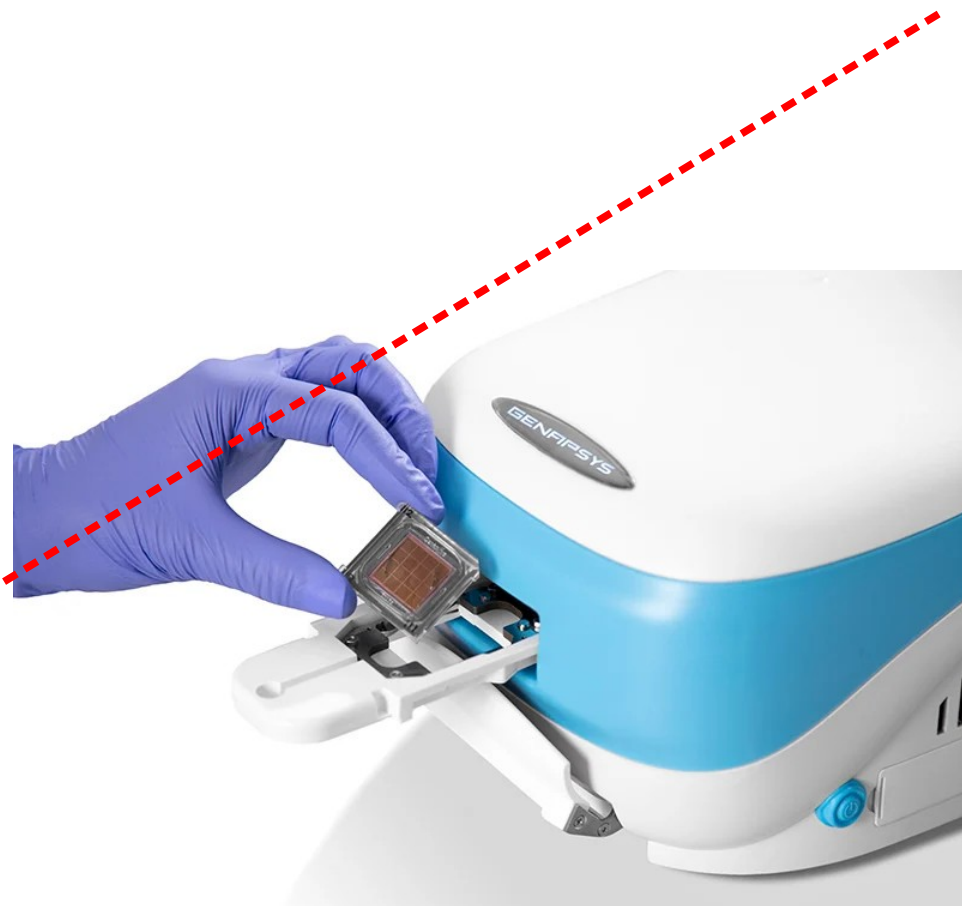
Ion S5

Kapacita 10+GB/běh

Masivně paralelní sekvenování

Technologie Genapsys

emPCR + SBS
Nativní nukleotidy v cyklech po jednom
Změny impedance



Masivně paralelní sekvenování

Technologie Ultima

emPCR + SBS

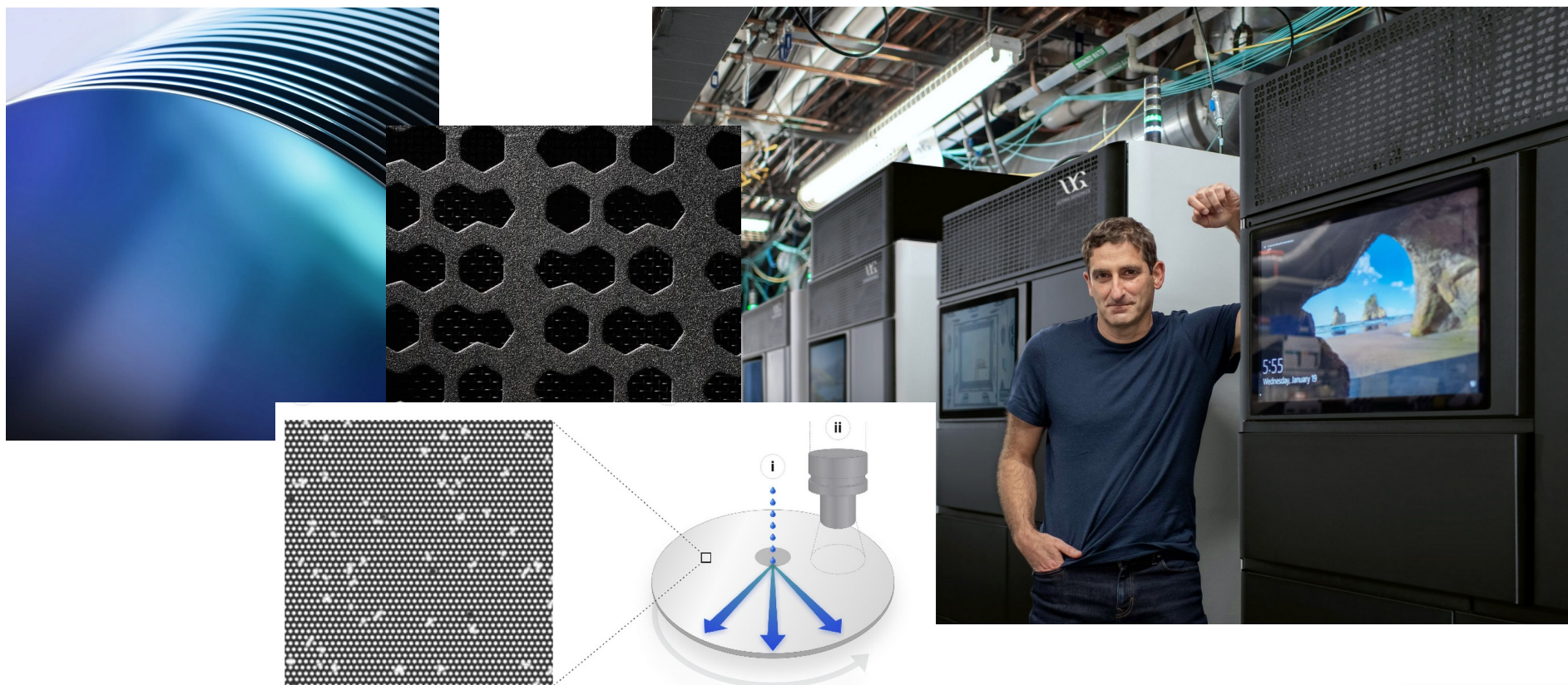
Nativní + fluorescenčně značené nukleotidy v cyklech po jednom

Optická (fluorescenční) detekce

Znovupoužitelný substrát

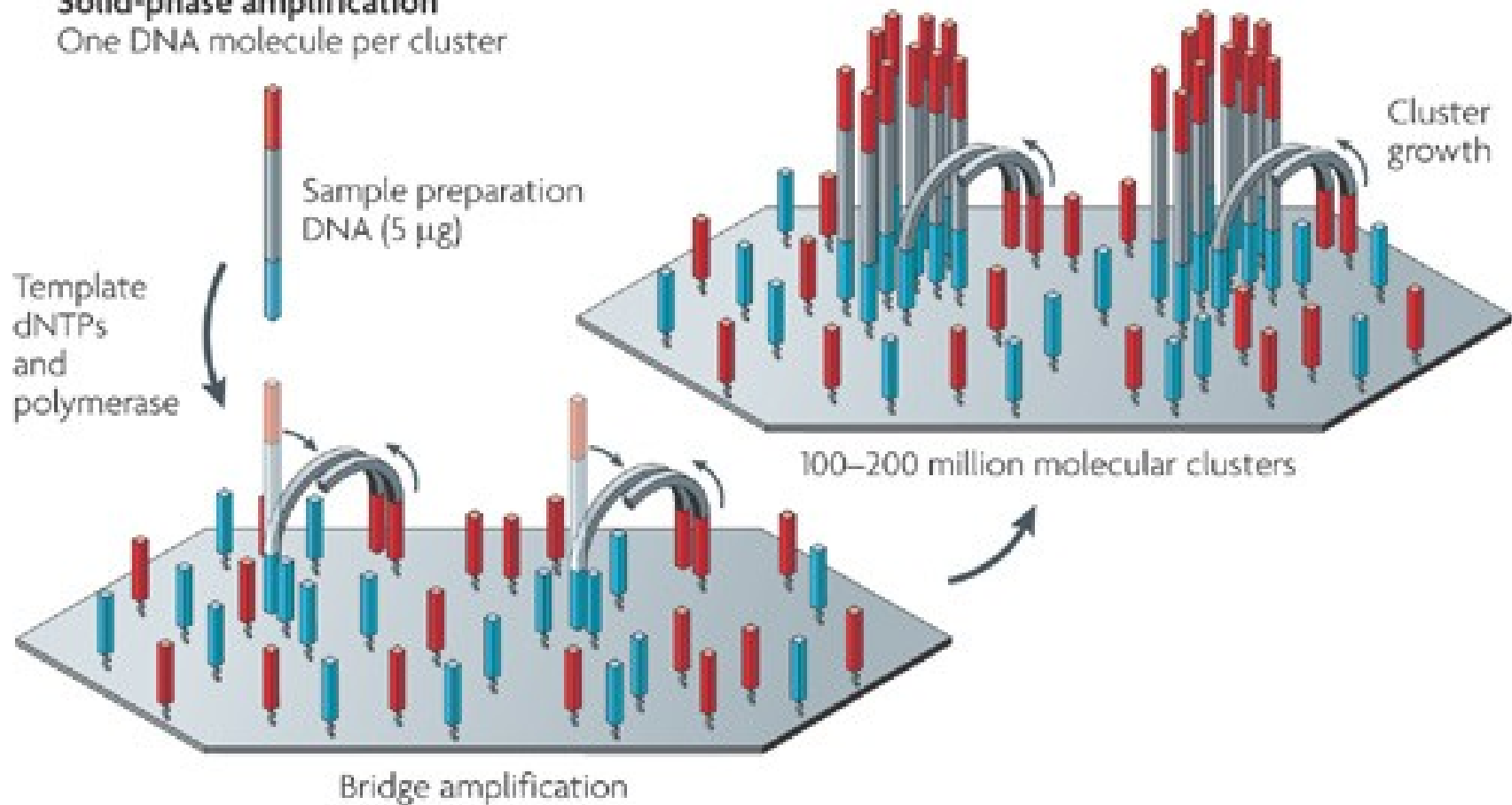
Rotační design

\$100/genom



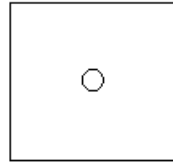
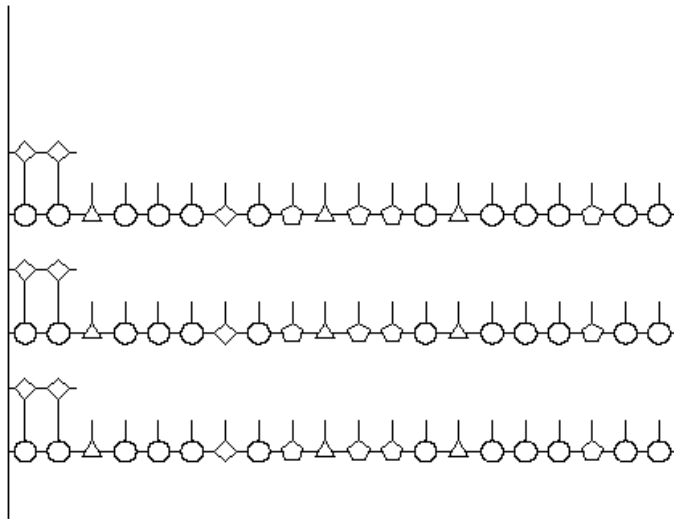
Bridge amplifikace

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



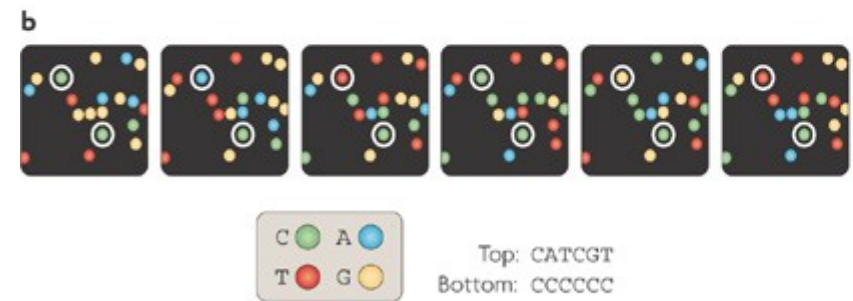
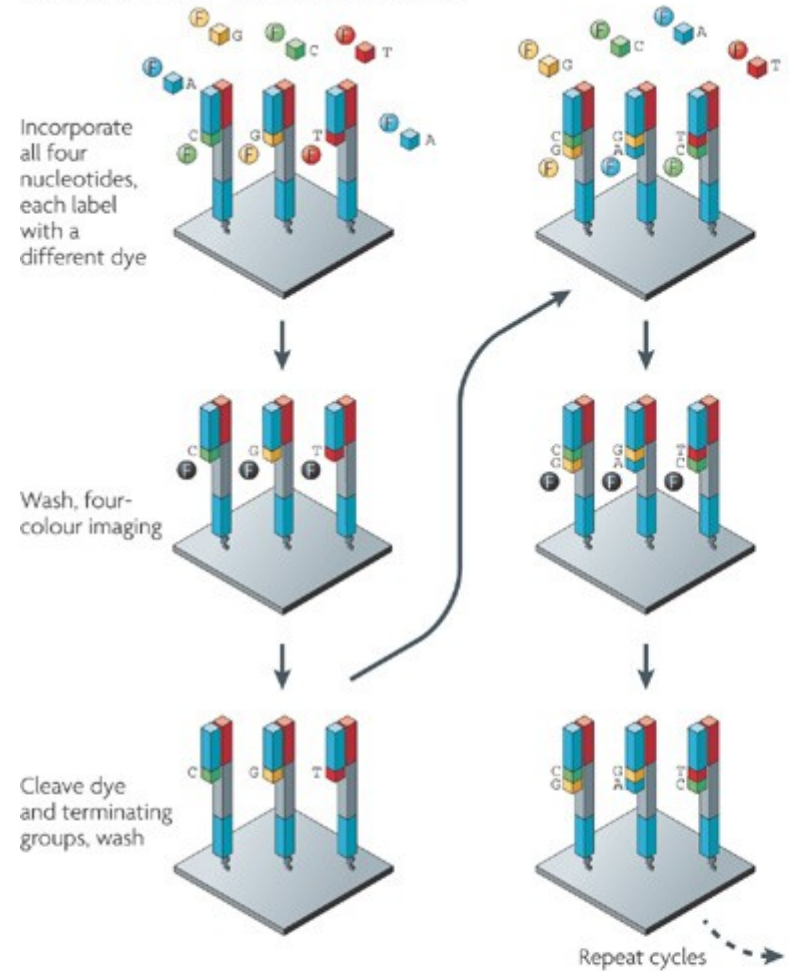
Masivně paralelní sekvenování

Sekvenování s reverzibilními terminátory

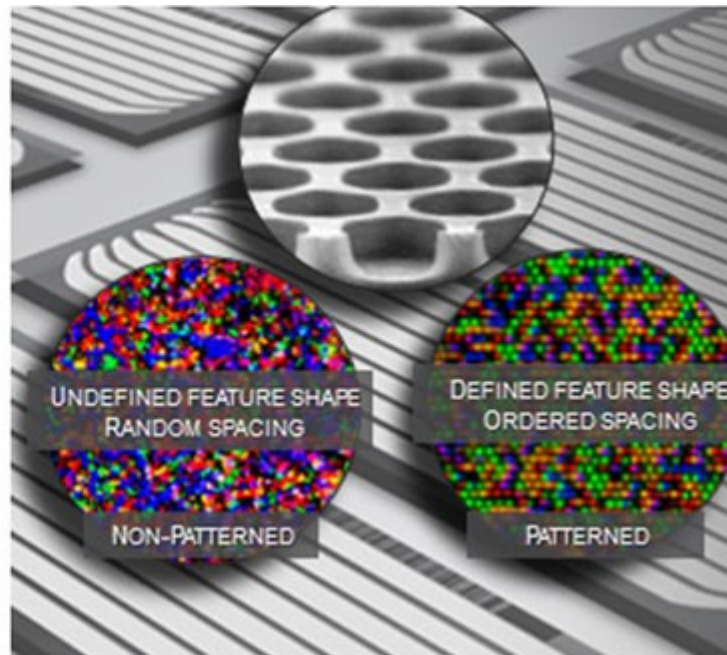
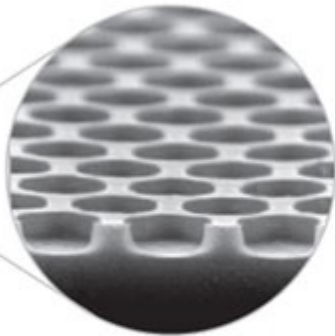


Technologie Illumina

a Illumina/Solexa — Reversible terminators

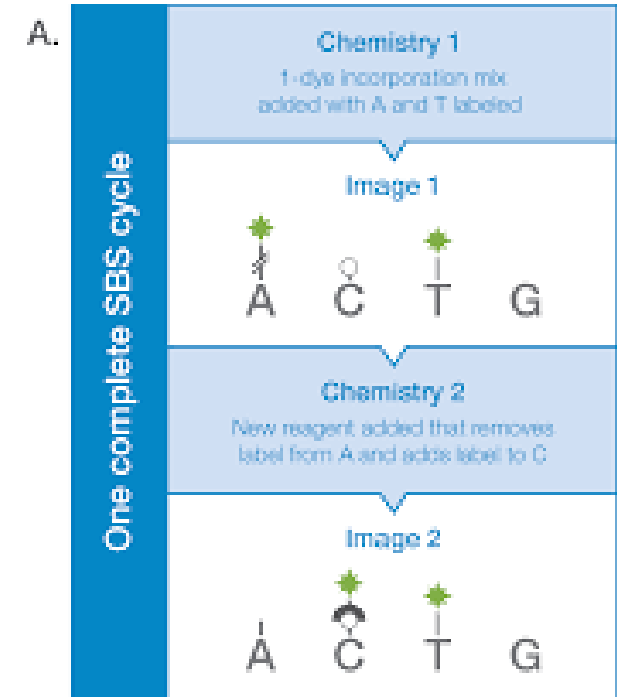
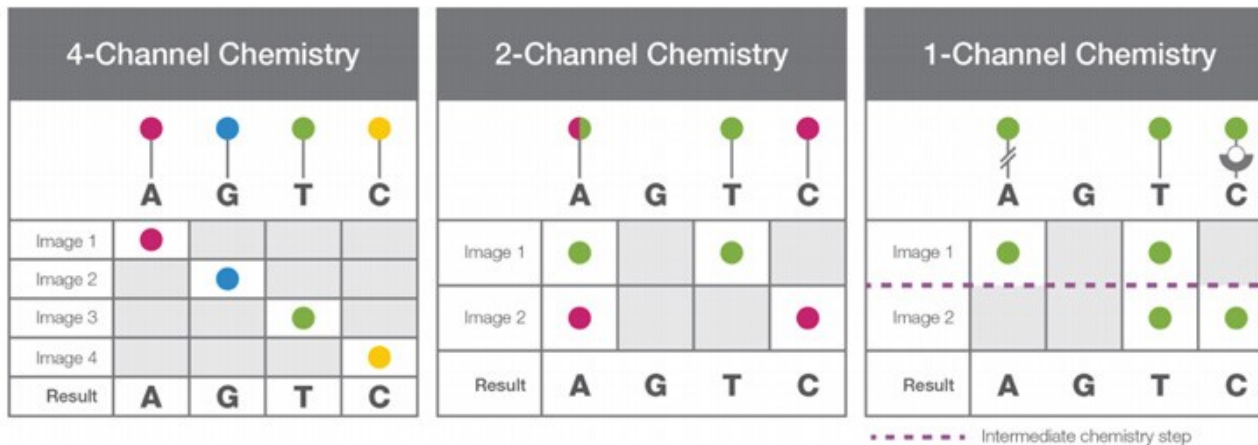


Patterned flowcell + exclusive amplification



<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



NovaSeq

Kapacita 48 genomů/běh (150/týden) , 6TB/běh



NextSeq
2000

Kapacita 3
genomy/běh
(9/týden),
360GB/běh



iSeq

Kapacita 0,01
genomu/běh,
1,2GB/běh



NextSeq 550

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

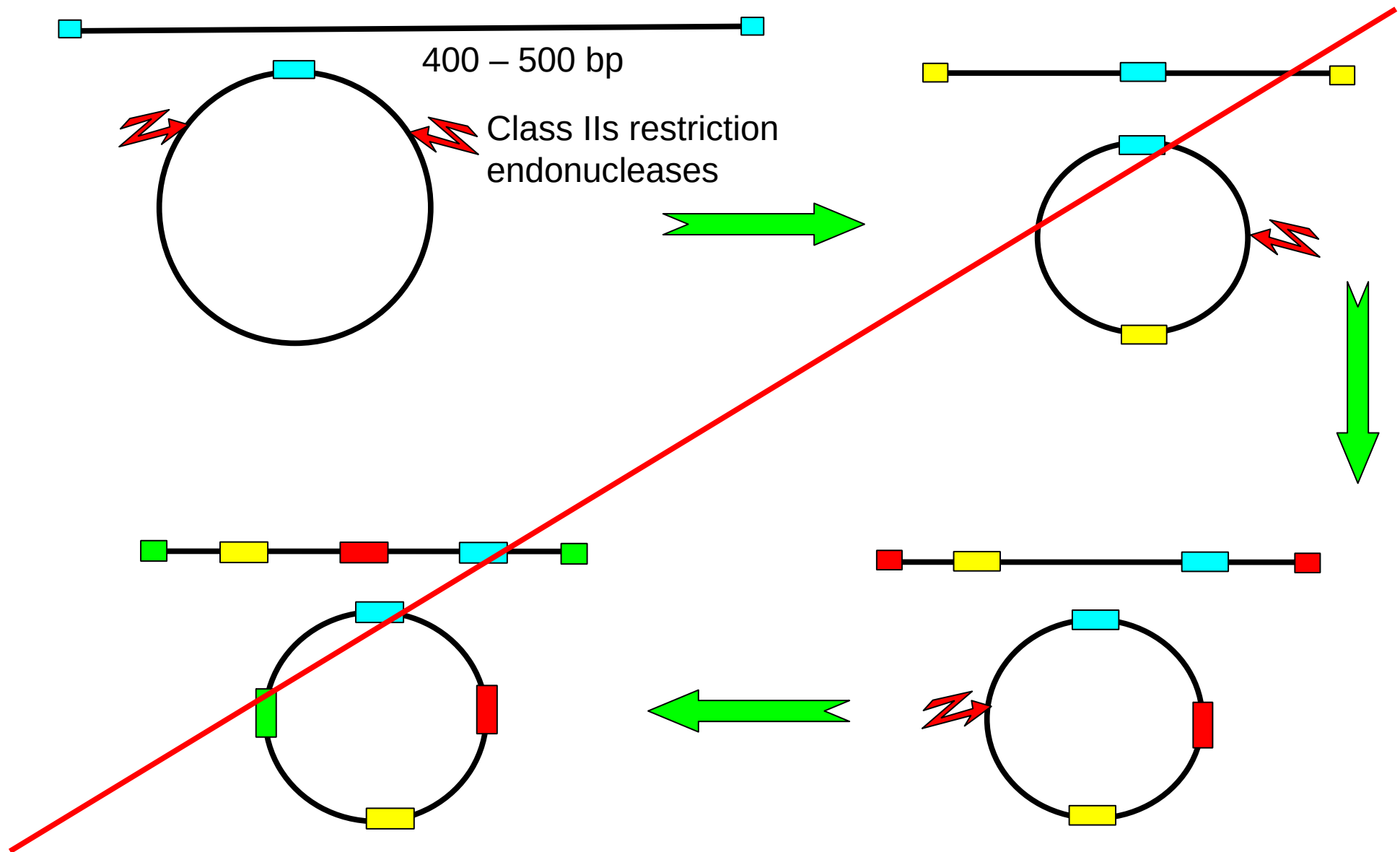
Qiagen GeneReader

Uzavřená technologie
emPCR + SBS



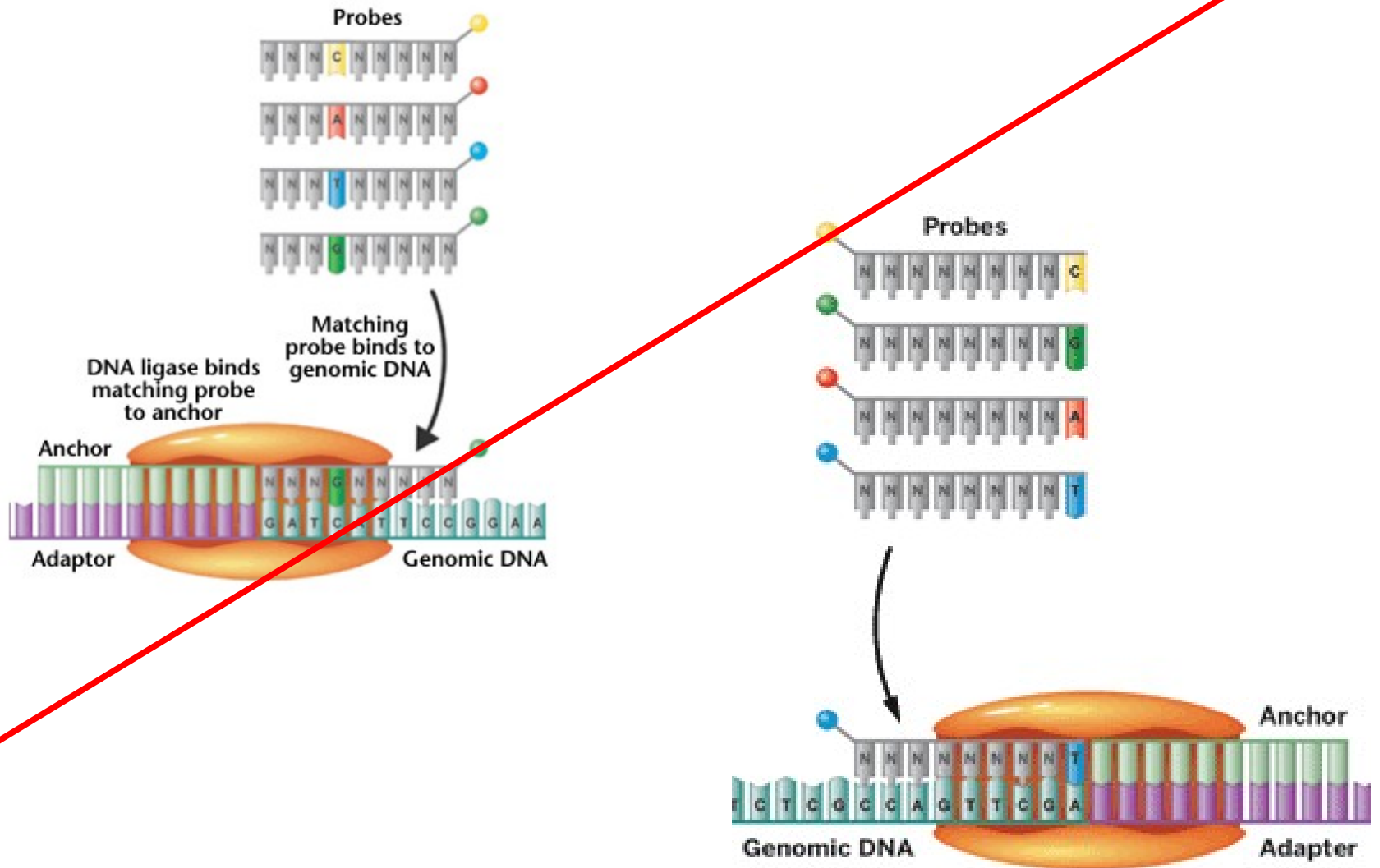
Masivně paralelní sekvenování

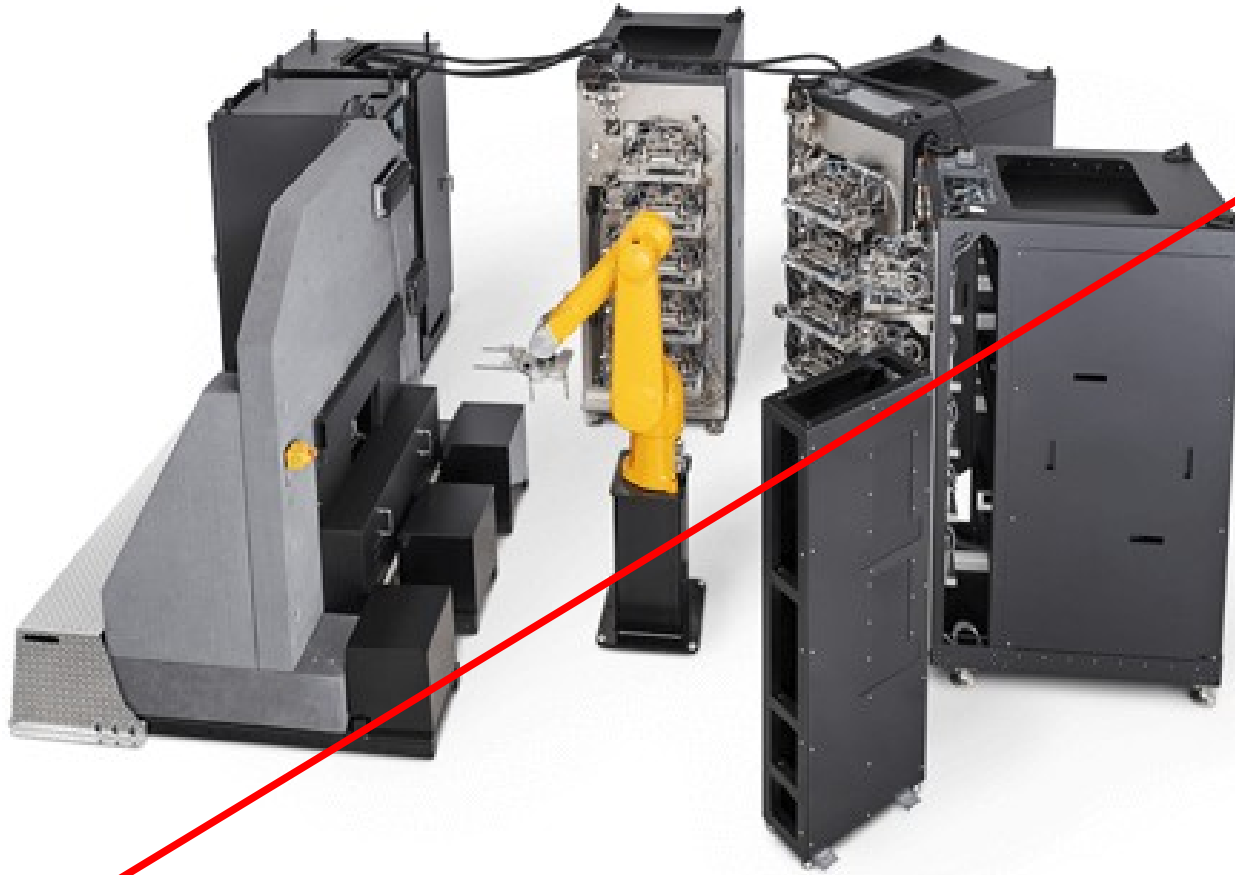
Technologie cPAL



Masivně paralelní sekvenování

Sekvenování (hybridizací a) ligací



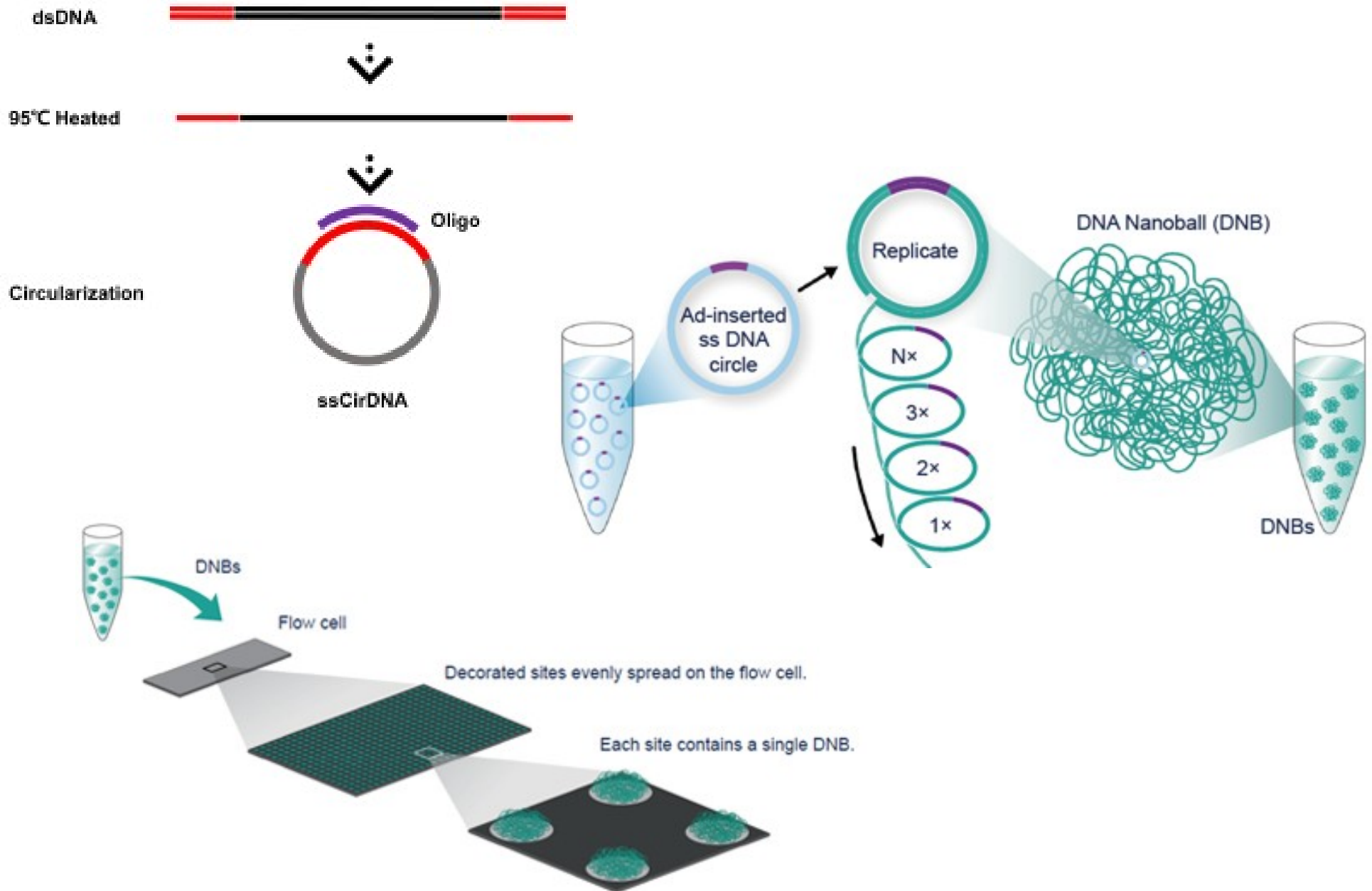


Kompletní systém pro sekvenování lidských genomů a exomů

Výrobce BGI (Čína)

Kapacita 12.000 genomů/rok, cena \$ 12M

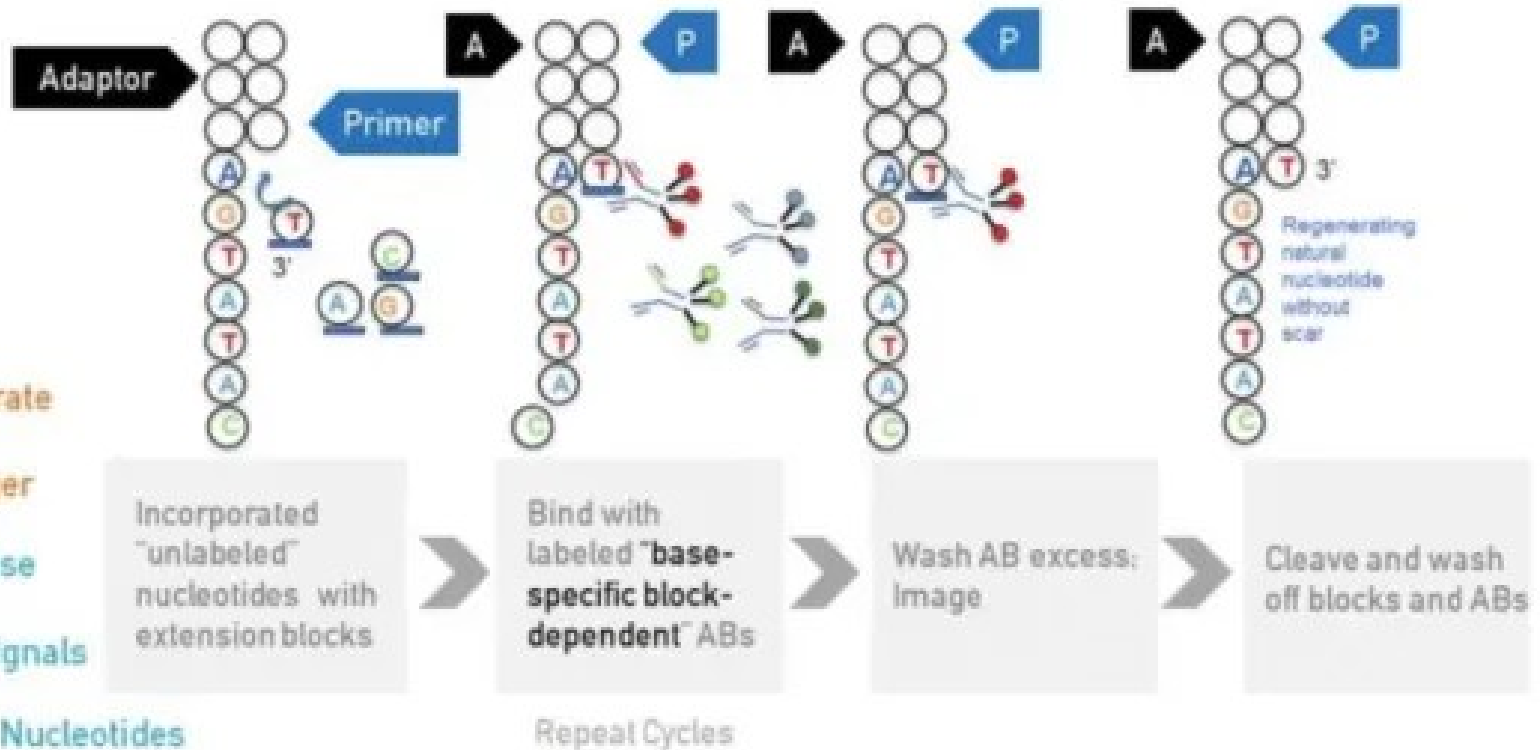
Masivně paralelní sekvenování



Masivně paralelní sekvenování

CoolNGS Chemistry in cPAS

Unlabeled Nucleotides and Natural Base



- More accurate
- Read Longer
- Natural Base
- Brighter Signals
- Unlabeled Nucleotides

Masivně paralelní sekvenování

Technologie cPAS



DNBSEQ-T7

20G/6Tb



DNBSEQ-G400

3,5G/1,4Tb



\$100/genom

DNBSEQ-T10



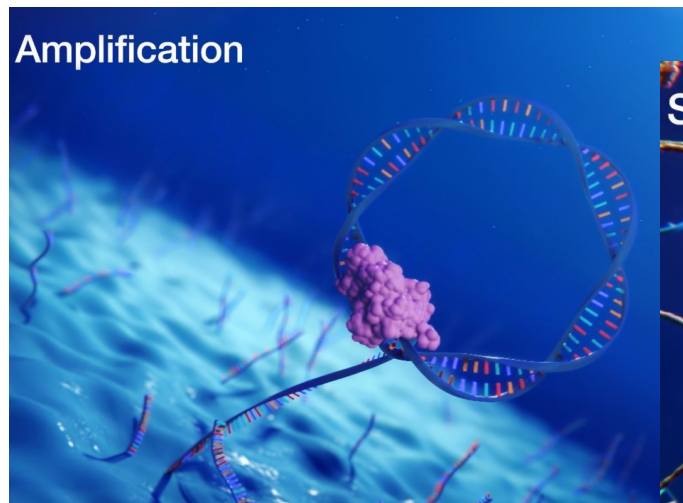
DNBSEQ-G50

300M/60Gb

Rolling circle amplification

Sequencing by synthesis/binding

Avidites



Masivně paralelní sekvenování

Singular Genomics

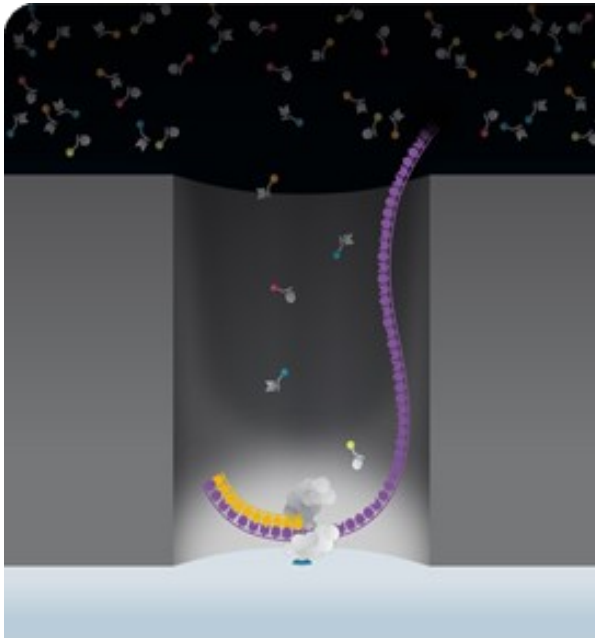
Clonal amplification - ???
SBS s reverzibilními terminátory



Masivně paralelní sekvenování

Technologie SMRT

(Single Molecule Real Time)

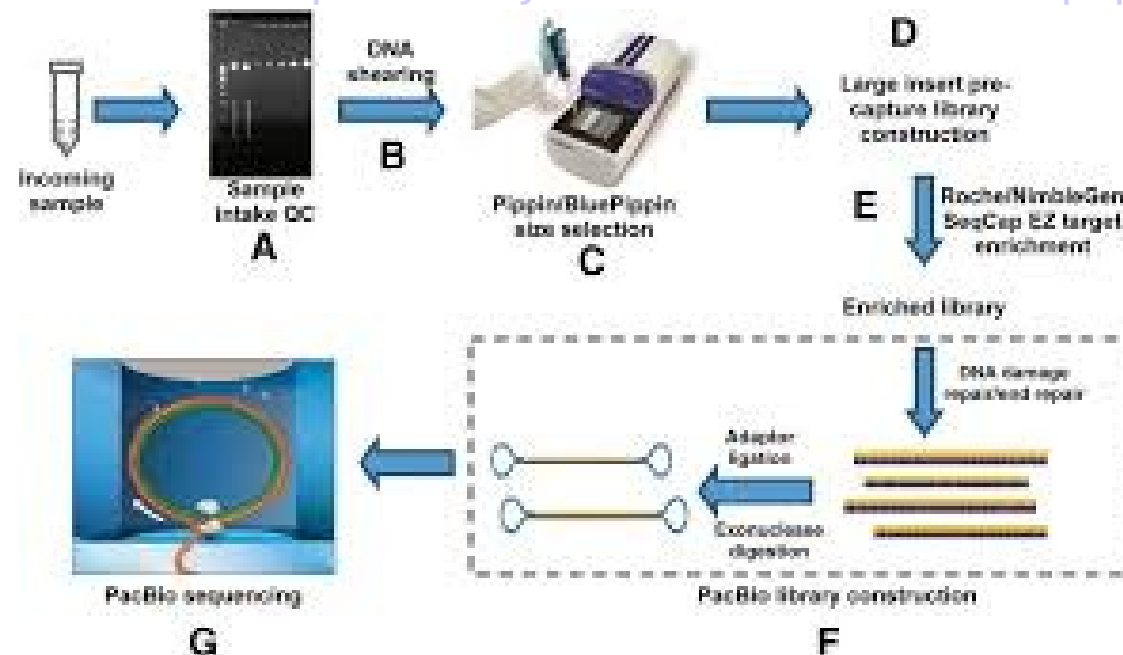


With an active polymerase immobilized at the bottom of each ZMW, nucleotides diffuse into the ZMW chamber. In order to detect incorporation events and identify the base, each of the four nucleotides A, C, G and T are labeled with a different fluorescent color. Since only the bottom 30nm of the ZMW is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



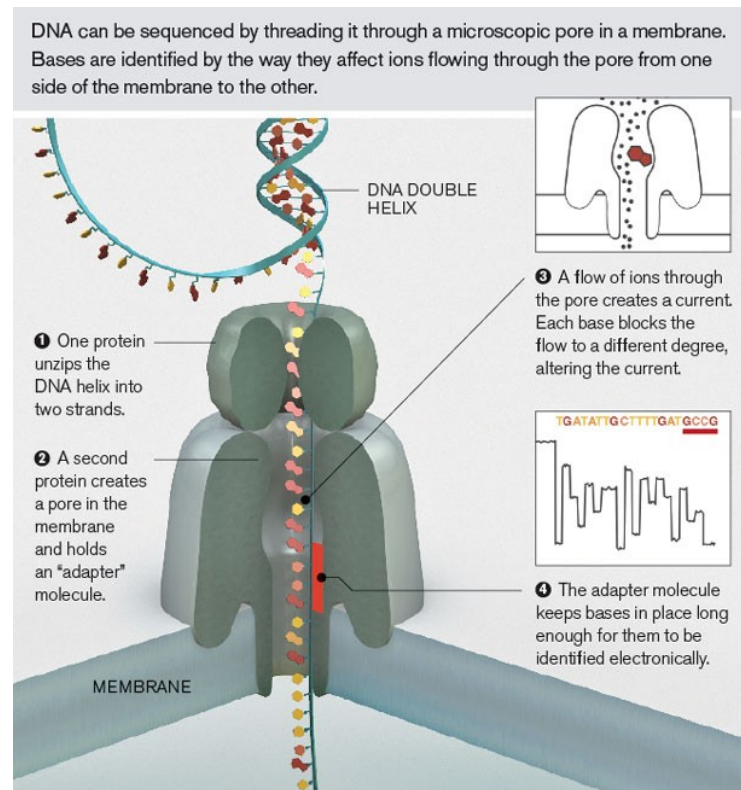
'Strand sequencing' is a technique that passes intact DNA polymers through a protein nanopore, sequencing in real-time as the DNA translocates the pore.

SmidgION
MinION
GridION
PromethION

<https://www.nanoporetech.com>

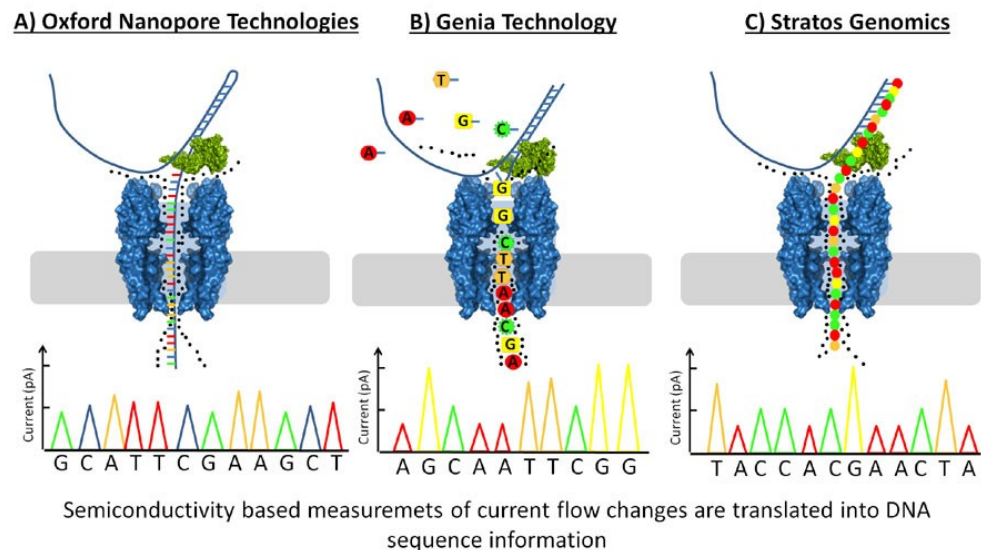
<https://www.youtube.com/watch?v=hs0FdiTHMbc>

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

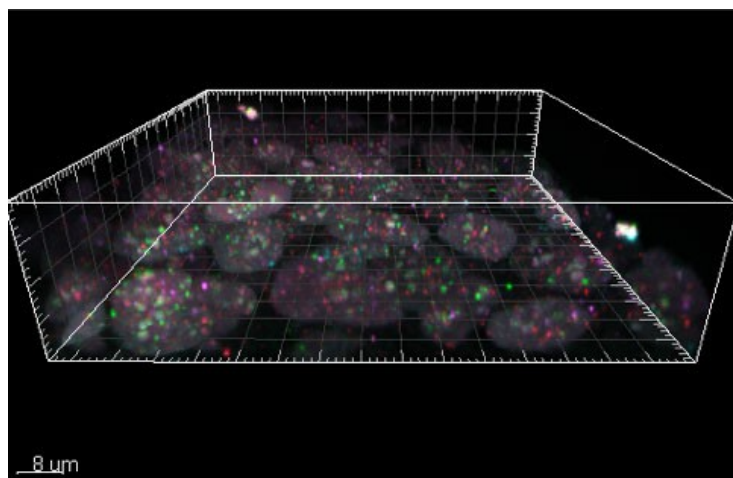


Masivně paralelní sekvenování

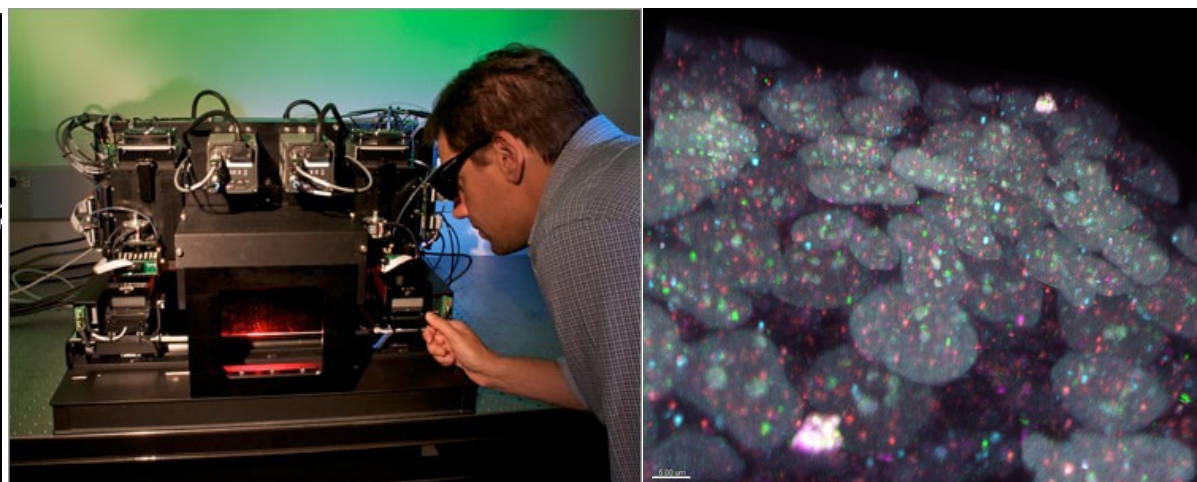
Nanopore Sequencing Technologies



Fluorescent In Situ Sequencing



ReadCooR



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

