



LÉKAŘSKÁ FAKULTA MASARYKOVY UNIVERSITY  
Interní hematoonkologická klinika LF MU a FN Brno  
Centrum molekulární biologie a genové terapie



# Moderní metody analýzy genomu

## Masivně paralelní sekvenování I

20.3. 2013

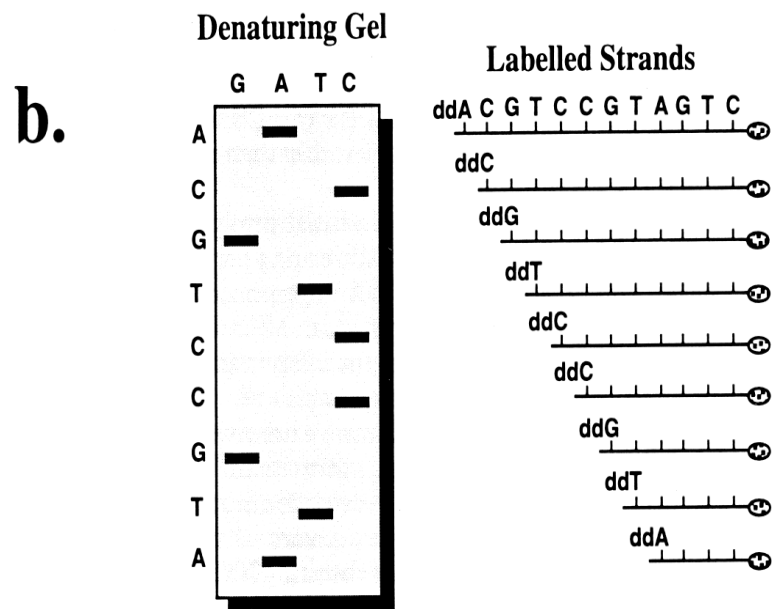
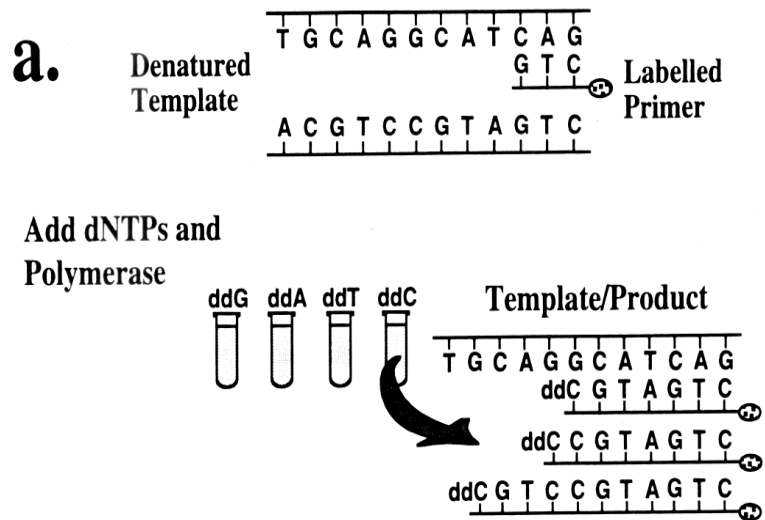
Boris Tichý



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována  
Evropským sociálním fondem  
a státním rozpočtem České republiky

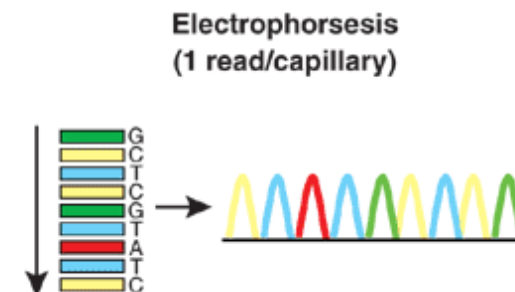
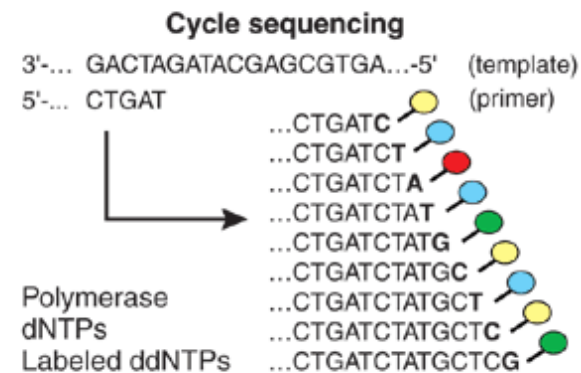
# Sekven(c)ování



Gel → kapilární elektroforéza

Dideoxy-NTPs → ukončení polymerace

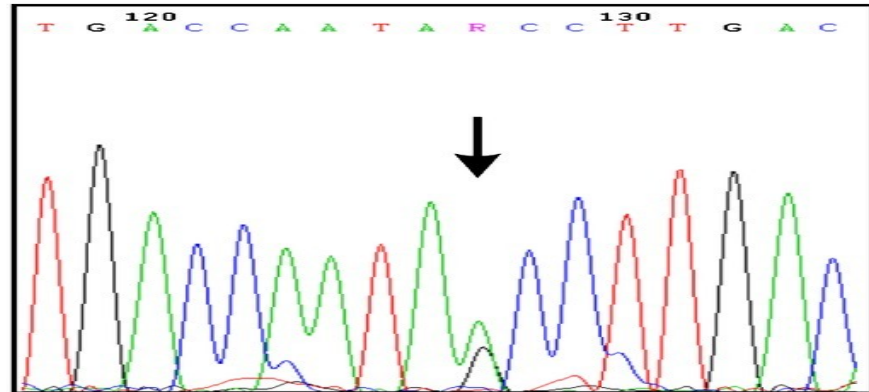
Značené primery nebo ddNTPs



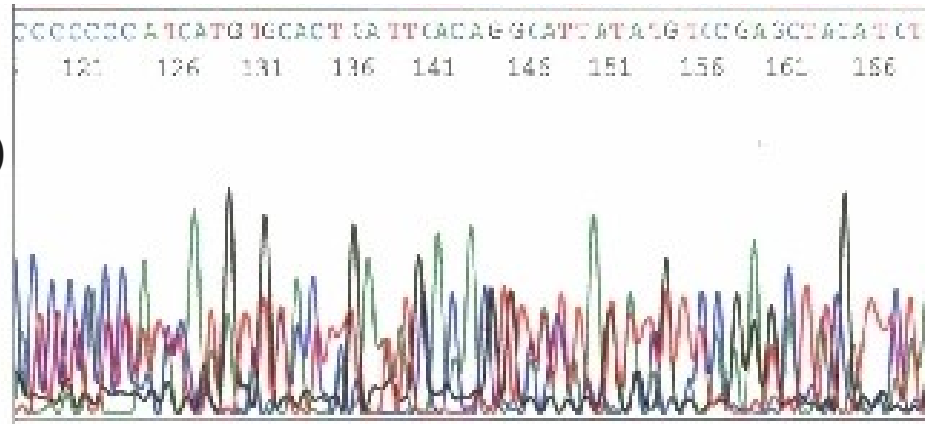
# Sekven(c)ování

Analyzuje směs DNA fragmentů

Heterozygotní mutace (1:1) →



Směs fragmentů  
(např. nespecifická PCR amplifikace)



Jednotlivé fragmenty (jednotlivé alely z jednotlivých buněk)  
→ klonování a sekvenování

# Masivně paralelní sekvenování

PCR amplifikace jednotlivých DNA fragmentů a sekvenování

nebo

Sekvenování jednotlivých DNA fragmentů

= Single molecule sequencing

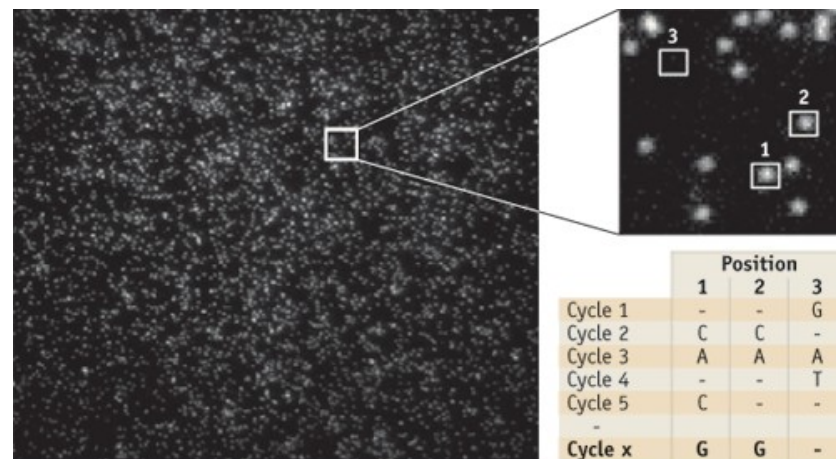
Technologie a přístroje přizpůsobeny paralelizaci

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 – klonální amplifikace

Paralelizace a miniaturizace PCR (nebo podobné metody)

Emulzní PCR

Bridge amplifikace

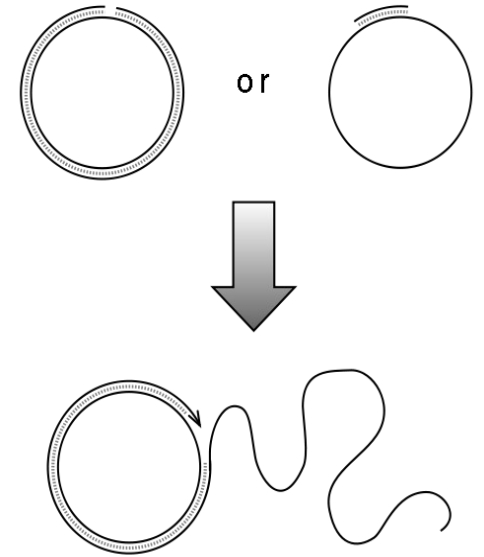
Rolling circle amplifikace

Droplet PCR

Snaha o sjednocení PCR podmínek

Primery shodné pro všechny sekvence (ligace adaptorů)

! GC-rich oblasti vždy obtížné

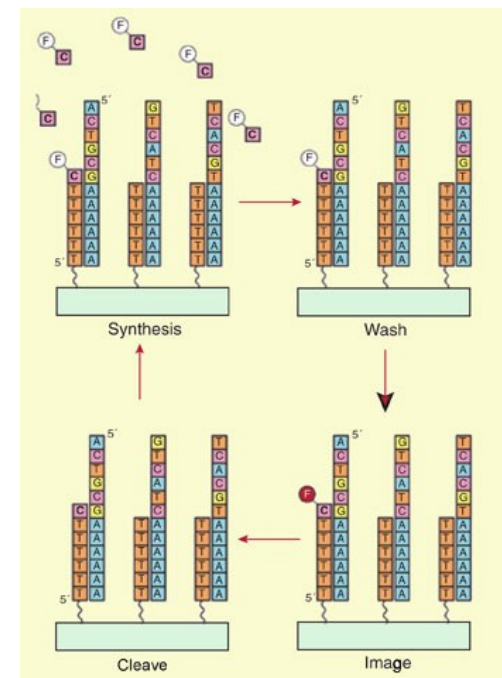


# Masivně paralelní sekvenování

Sequencing by synthesis

Polymeráza

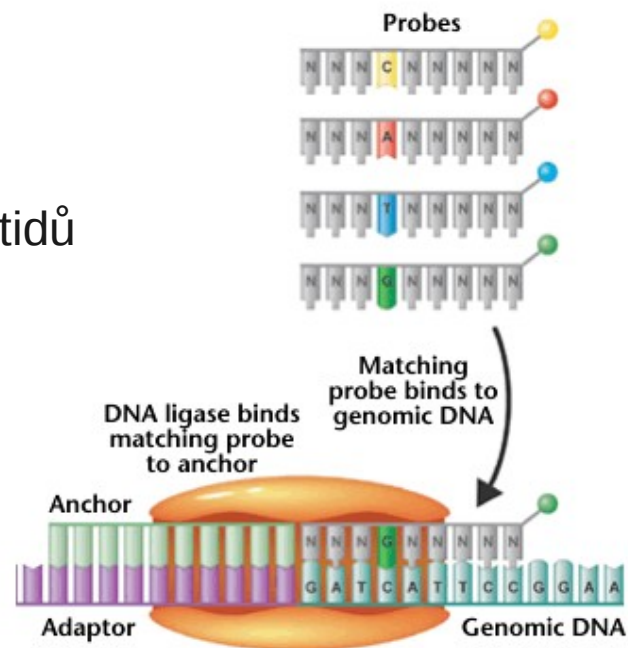
Sestavování nového řetězce z jednotlivých nukleotidů



Sequencing by ligation

Ligáza

Sestavování nového řetězce z oligonukleotidů



# Masivně paralelní sekvenování

## Technologie Roche/454

První na trhu

Emulzní PCR + pyrosekvenování

Picotiter plate

Sekvenační reakce ve vlastních  
(mikro)jamkách

Dlouhé fragmenty, malá kapacita

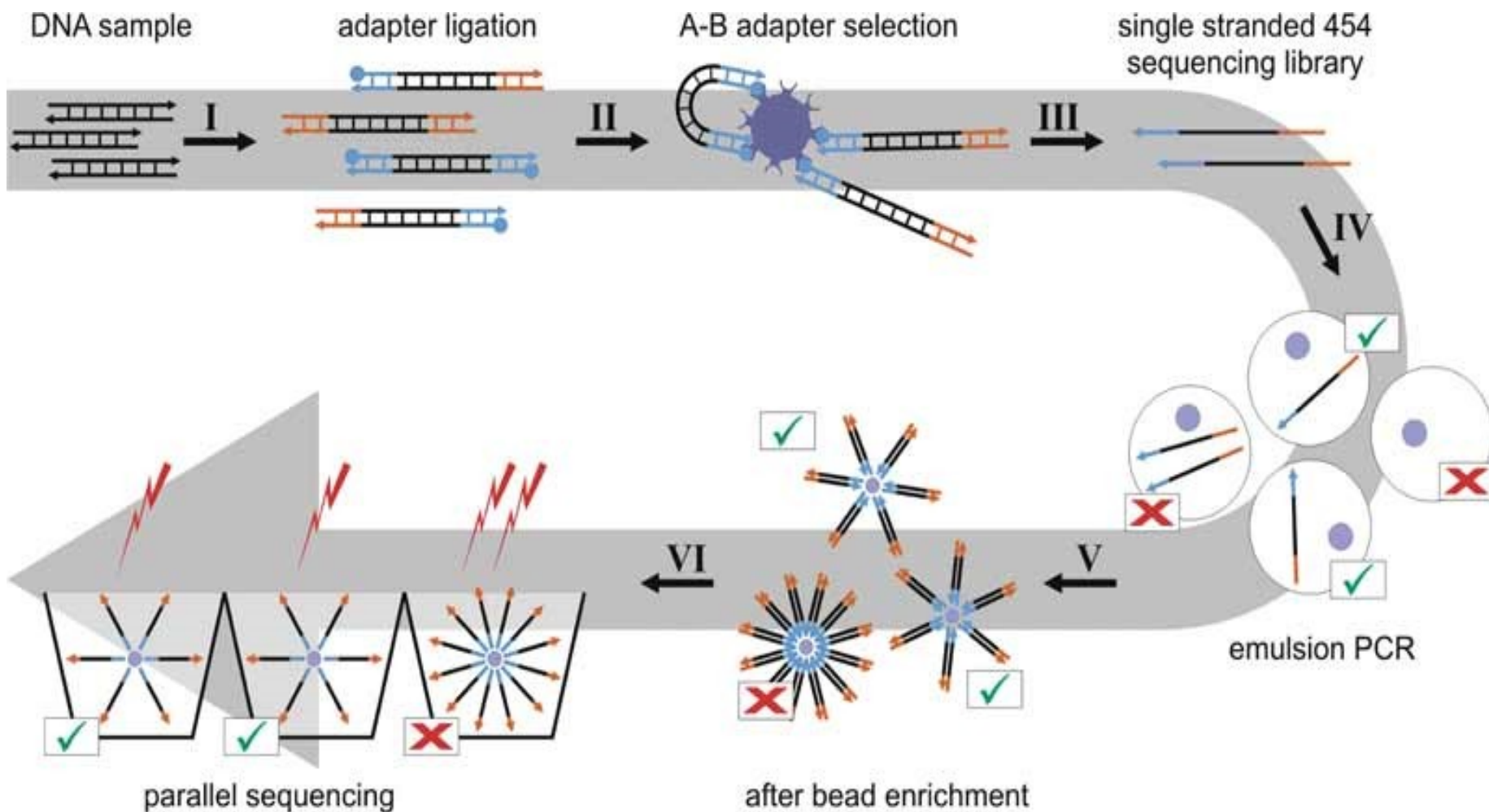
Chemie

Nemodifikované nukleotidy

Jeden typ nukleotidu/cyklus



## Emulzní PCR

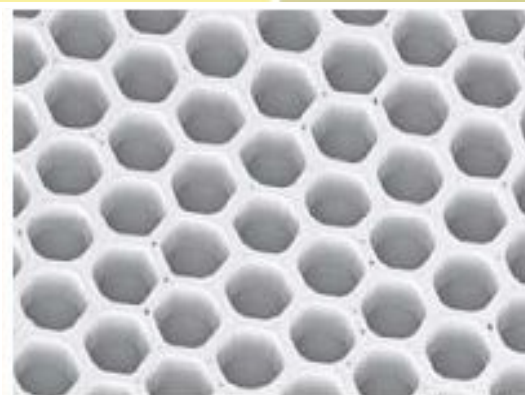
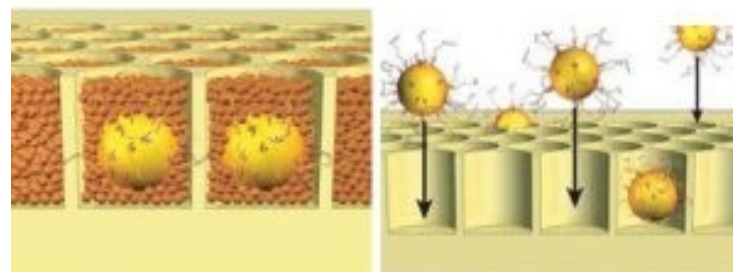
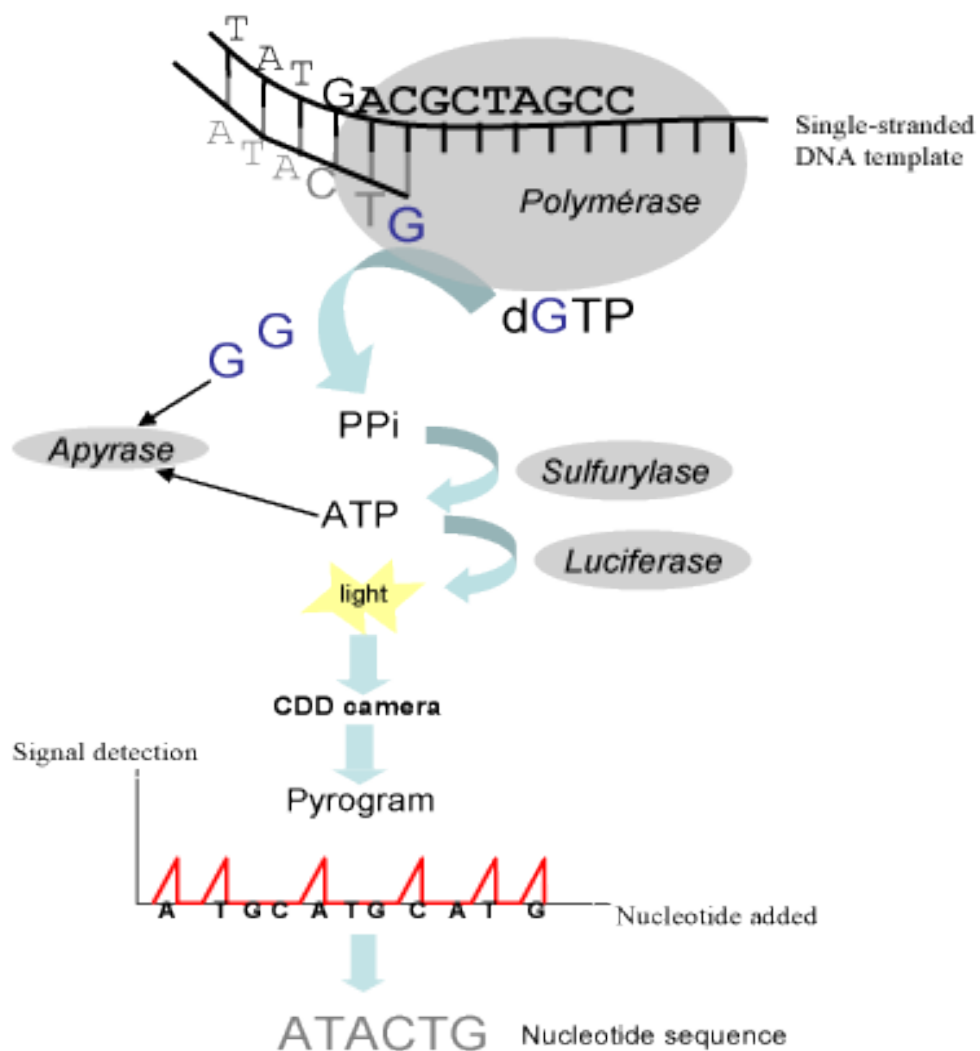




# Masivně paralelní sekvenování

Technologie Roche/454

## Pyrosekvenování



# Masivně paralelní sekvenování

Technologie Roche/454

## Výhody

Dlouhé sekvence

Diagnostika - Roche

## Nevýhody

Chybovost - homopolymerní úseky

Cena/kapacita

Pracnost

Standardizace

Malá kapacita – analýzy exprese RNA obtížné

## Dostupné přístroje

Genome Sequencer FLX

GS Junior



# Masivně paralelní sekvenování

Technologie Ion Torrent, Ion Proton

Emulzní PCR

Monitorování  $H^+$  uvolněných při inkorporaci nukleotidu

Speciální čipy

Sekvenační reakce ve vlastních (mikro)jamkách, dno tvoří polovodičová elektroda citlivá na pH

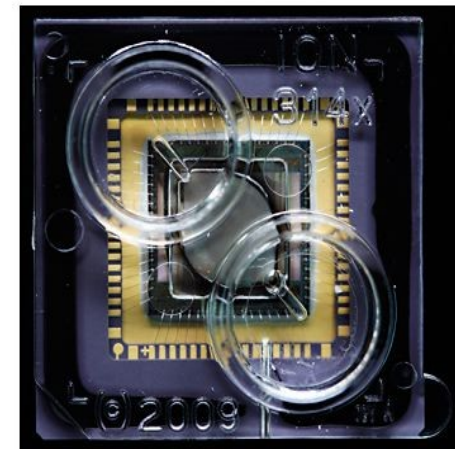
Zatím kratší fragmenty (200+), rychlé

Nízká cena, kapacita 10Mb - 100Gb

Chemie

Nemodifikované nukleotidy

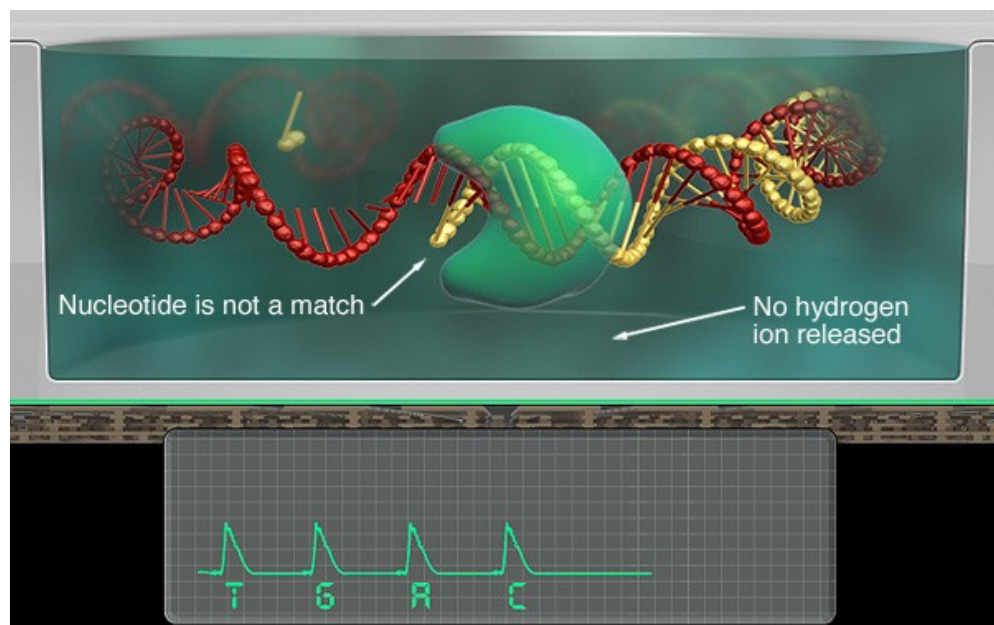
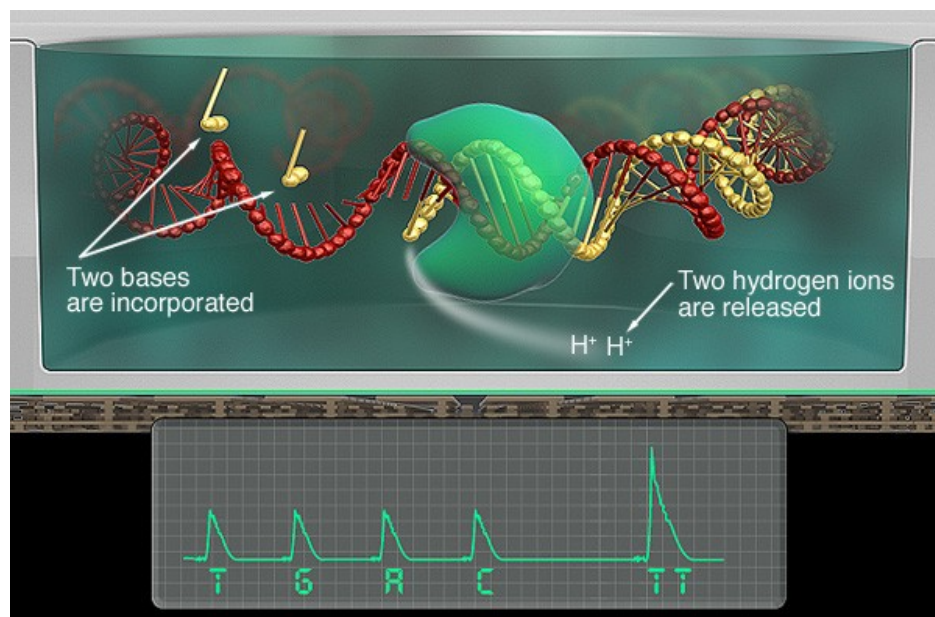
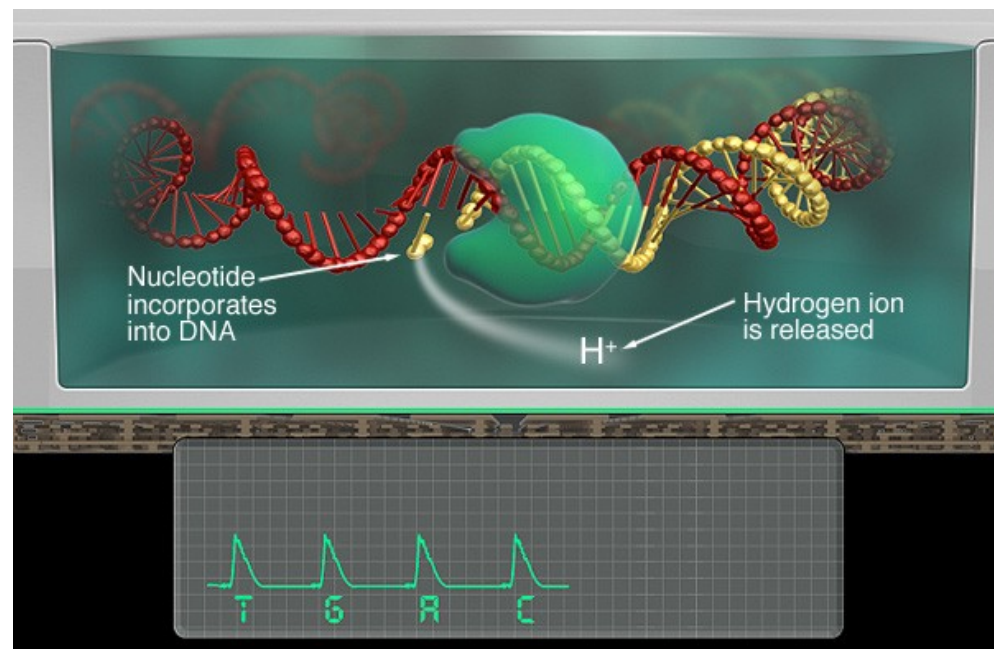
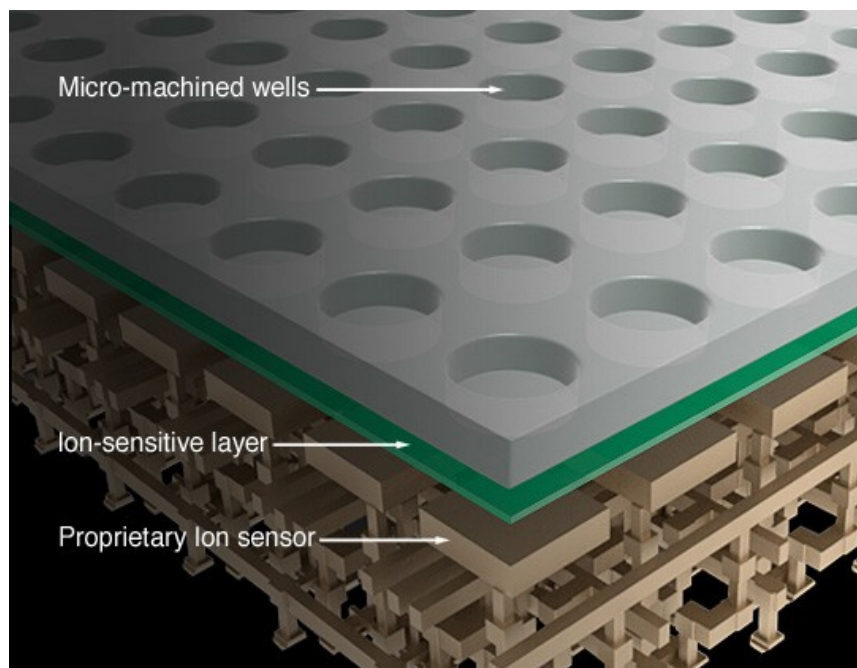
Jeden typ nukleotidu/cyklus





# Masivně paralelní sekvenování

# Technologie Ion Torrent



<http://www.youtube.com/watch?v=nFfgWGFe0aA>

<http://www.youtube.com/watch?v=yVf2295JqUg>

<http://www.youtube.com/watch?v=bFNjxKHP8Jc>