

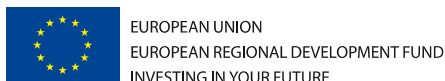


Central European Institute of Technology
BRNO | CZECH REPUBLIC

Moderní metody analýzy genomu - aplikace

Mgr. Nikola Tom

Brno, 24.3.2014



Možnosti aplikace NGS

- SNV (single nucleotide variant)
- InDel (krátké inserce a delece)
- Strukturalní varianty (dlouhé inserce delece, translokace, inverze, atp.)
- CNV (copy number variation)
- Analýza genové exprese
- De novo* assembly
- Epigenetika
- Metagenomika

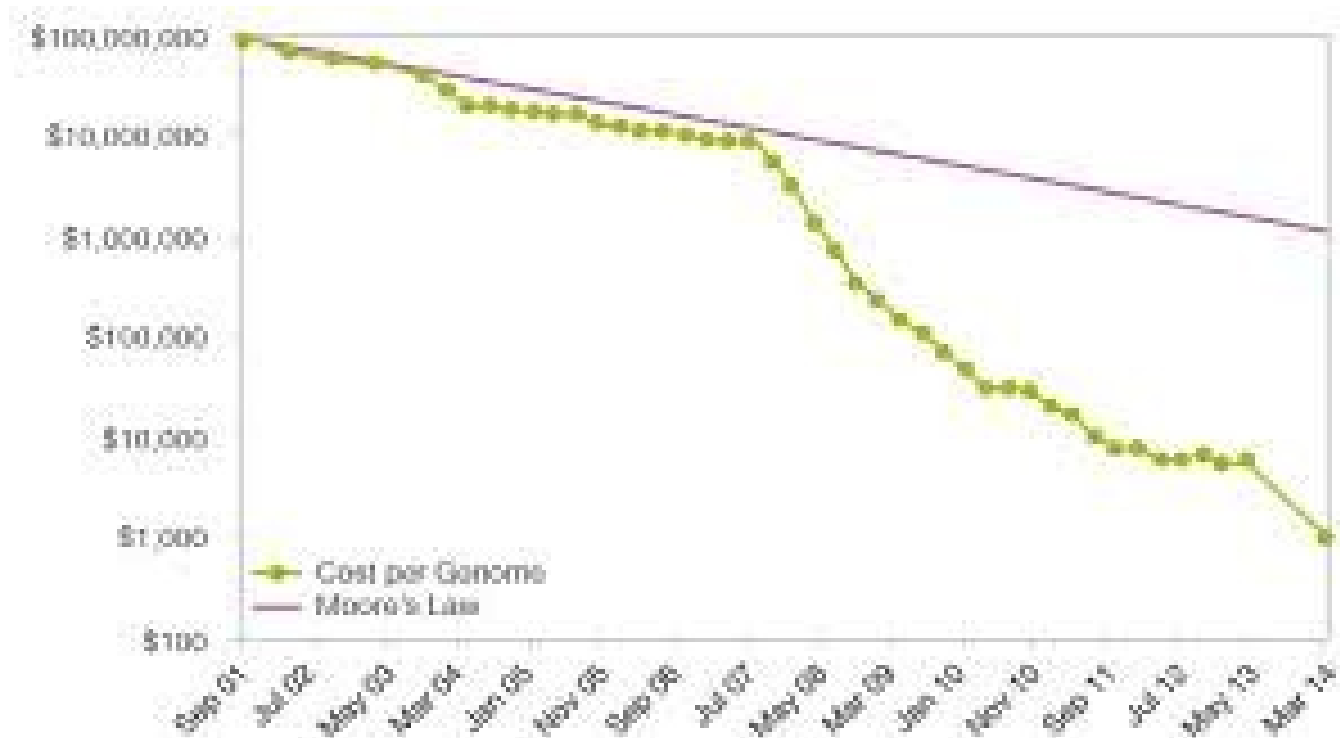


DNA sekvenování

- Whole genome re-sequencing
- Targeted re-sequencing
- *De novo* assembly

Whole genome re-sequencing

- < 1000 \$ (Illumina HiSeq X)
- Resekvenační microarrays (1 milion variant – 500 \$)



Asociační studie

- GWAS (genome-wide association study)
 - hl. SNP ve spojitosti se určitým fenotypem
 - Analýza komplexních onemocnění, predikce, prognóza, personalizovaná medicína, preventivní medicína, vývoj léčiv
 - Case – control studie
- HapMap Project (detekce haplotypů)
- 1000 genomes (SNP nad 1 %)

Targeted re-sequencing

- Sekvenování vybrané oblasti (target enrichment)
 - exom
 - chromozóm
 - gen
 - exon
- Využití multiplexování (amplikony, vzorky)
- Nižší cena
- Vyšší citlivost
- Diagnostika i výzkum

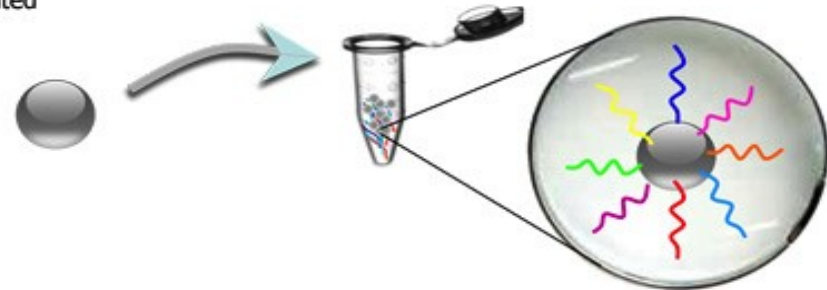
Target enrichment

- Hybridizace
 - Na čipu
 - V roztoku (levnější, vyšší uniformita pokrytí, méně vstupního materiálu)
- PCR (vhodná pro obohacení menších genomových oblastí – geny, skupiny genů)
 - Klasická PCR
 - Mikrofluidní (Fluidigm, Raindance)

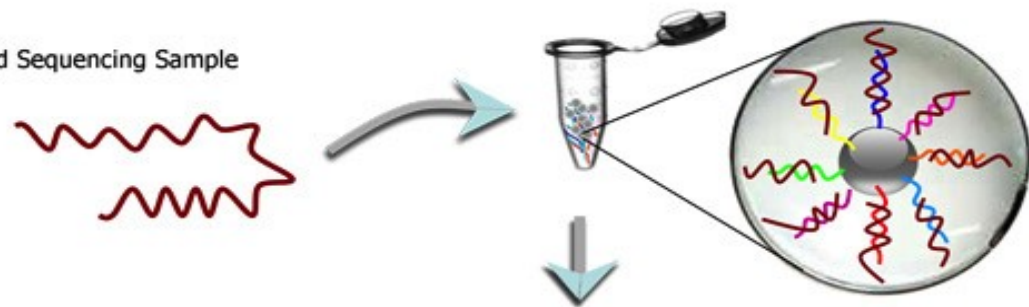
Hybridizace v roztoku

- Magnet
- Protilátky

1. Add Streptavidin Coated Magnetic Beads



2. Add Sequencing Sample



3. Apply magnet and wash

- Target sequences bound to beads are retained
- Unbound sequences are removed



4. Strip and recover enriched sample from beads



5. Proceed with standard sequencing sample preparation

Deep sequencing

= sekvenování s vysokým pokrytím

= určitý region je sekvenován $> 100x$

- Senzitivita dána chybovostí enzymů
- Analýza somatických mutací a polyklonálních nádorů (detekce klonů s výskytem $< 1\%$)
- Klonální evoluce
- Solidní tumory

Zkušnosti

- Whole genome (SOLiD 5500, ABI)
- Exomové sekvenování u CLL pacientů (SOLiD 5500, ABI)
- Panel genů u pacientů s Duchenova muskulární dystrofií (GS Junior, Roche)
- Deep sekvenování p53 u CLL, CML pacientů (Miseq, Illumina)

RNA sekvenování

- Analýza hladiny exprese
- Alternativní splicing
- Postranskripční změny
- Genové fúze
- Mutace v transkriptech
- *De novo* assembly

RNA sekvenování

- Transkriptomové sekvenování
 - Single end (kvantifikace)
 - Paired end (struktura transkriptů)
- Tag sekvenování
 - 3' tagy (kvantifikace bez informace o struktuře)
 - 5' tagy (identifikace cílů miRNA = degradome sequencing)
- Sekvenování krátkých RNA
 - Identifikace a kvantifikace miRNA, tRNA

Analýza exprese

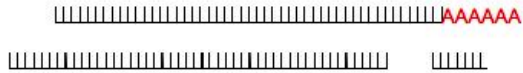
- Analýza exprese konkrétní alely (GWAS) – může být rozdíl od genotypu
- Množství mRNA nekoreluje s hladinou proteinů
- Místo a čas specifické
- Chybí info o intronové sekvenci (regulatorní fce)
- Náročnost bioinformatického zpracování a interpretace (biologická, klinická a regulatorní funkce)
- Data storage, speciální algoritmy (mapování)
- Cena

Izolace RNA

- **mRNA**
- Oligo-dT
 - 3' konec
- Hexamer priming
 - 5' konec
- **ncRNA**
- PolyA selekce vs. rRNA deplece
 - Zastoupení non-polyA (non-coding) RNA
- Podle délky z gelu (miRNA, tRNA)

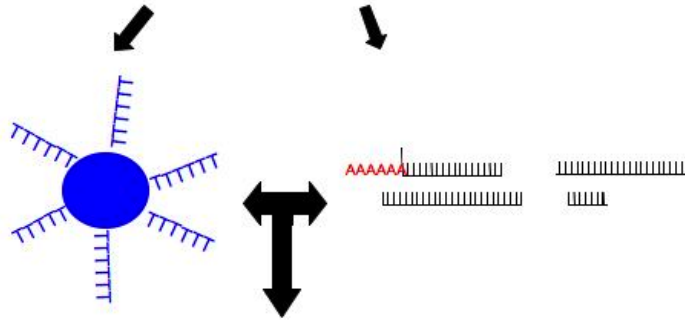
Isolate mRNA

Isolate Total RNA

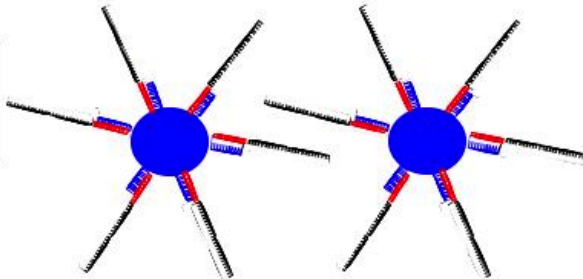


Fragmentation
and/or Isolation

In this case, isolation via Poly(T)
coated magnetic beads

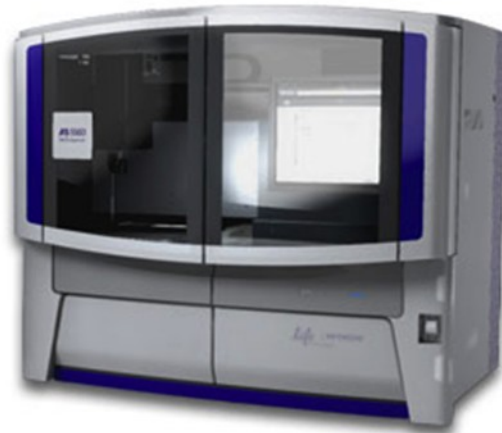


Poly(A) RNA molecules
bind to the Poly(T)
magnetic beads



Zkušnosti

- miRNA (SOLiD 5500)



Epigenomika

- Reverzibilní změny DNA nebo histonů ovlivňující genovou expresi a regulaci bez změny struktury DNA
- Methylace DNA (v místě promotoru)
- Modifikace histonů

Metylace DNA

- MeDIP – imunoprecipitace methylované DNA
 - Protilátka rozpoznávající Met-C
 - Pozice metylovaných úseků DNA
- Bisulfite sekvenování
 - Konverze C → U, Met-C se nemění
 - Přesná identifikace jednotlivých metylovaných bazí

Modifikace histonů

- Detekce DNA sekvence s navázaným histonem

