

Technologie sekvenování

- stanovení pořadí nukleotidů v molekule DNA (primární struktura)

Důvody řešení genomových projektů

- ◆ Genomika modelových organismů (*de novo* sekvenování)
- ◆ Analýza mutací a SNP, výzkum genetických onemocnění (resekvenování genomů)
- ◆ Identifikace mikroorganismů (*de novo* sekvenování a resekvenování)
- ◆ Analýza transkriptomu (RNAseq)
- ◆ DNA metylační studie (medip-seq, bisulfite treated DNA)
- ◆ Studie transkripčních faktorů, proteinů vázajících se na DNA (ChIPseq)
- ◆ miRNAs, siRNA, piRNA, tRF, aj... (small RNA seq)
- ◆ Metagenomika (16S rRNA, celé metagenomy)

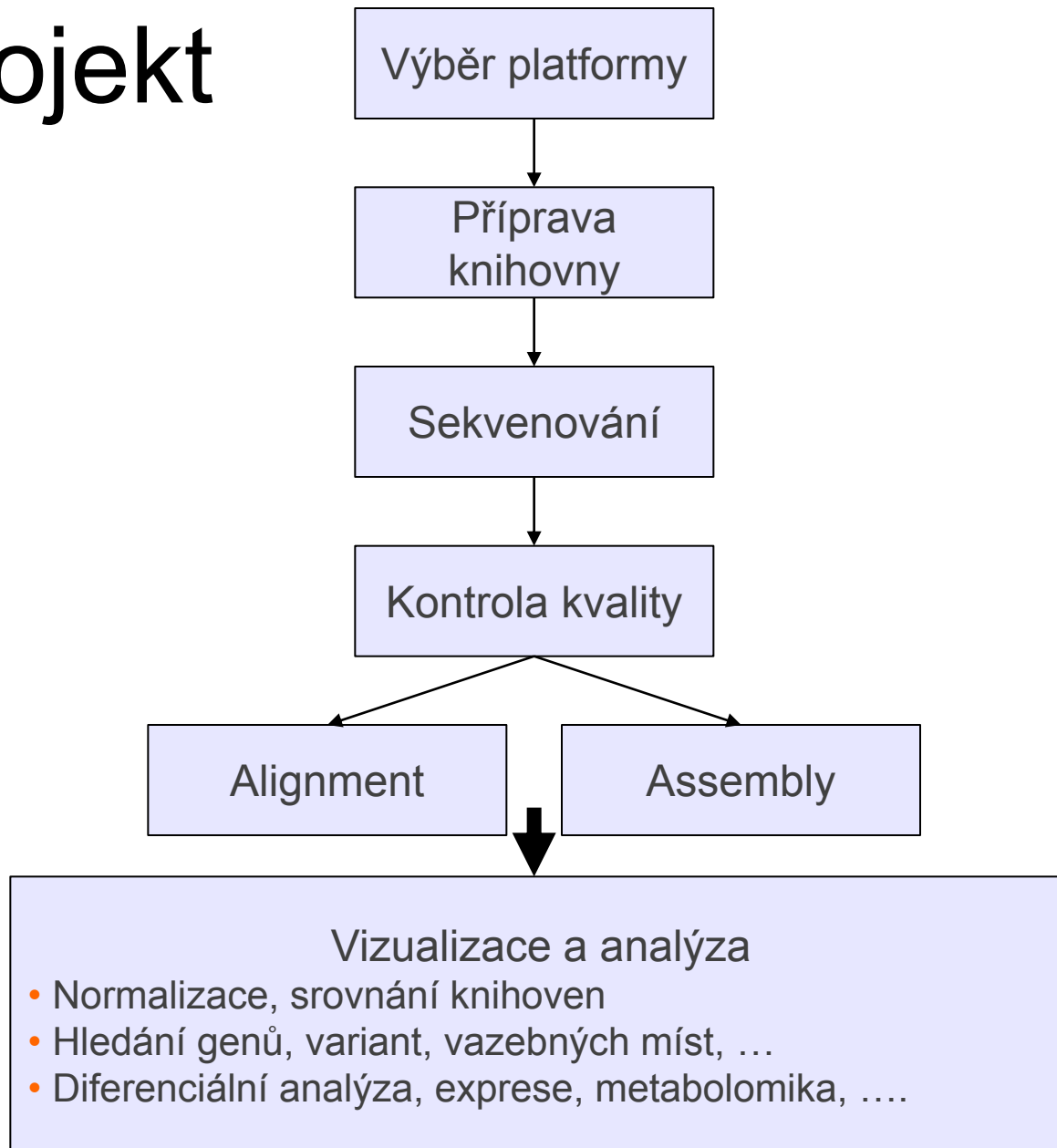
Techniky sekvenování

- Klasické techniky:
 - Chemická (Maxamova-Gilbertova)
 - Již se nepoužívá
 - **Enzymová (Sangerova)**
 - V současnosti se používá automatická varianta
- Metody sekvenování nové generace (next generation sequencing, NGS)
 - **454, IonTorrent, Illumina, SoLiD**
- Metody sekvenování třetí generace
 - **PacBio, NanoPore, Helicos, etc.**

Vývoj sekvenačních metod

- **Klasické sekvenování kapilární elektroforézou**
 - Vyžaduje velký počet kopií vstupního materiálu DNA jako templátu pro přípravu jednořetězců
- **Sekvenování nové generace**
 - Jako templát slouží jediná molekula, která je amplifikována pro získání dostatečného signálu, produkuje **krátká** čtení, možnost kvantitativní analýzy (SNP)
- **Sekvenování třetí generace**
 - Jako templát slouží jediná molekula. Nevyužívá amplifikace za účelem zvýšení signálu, produkuje **dlouhá** čtení

Projekt

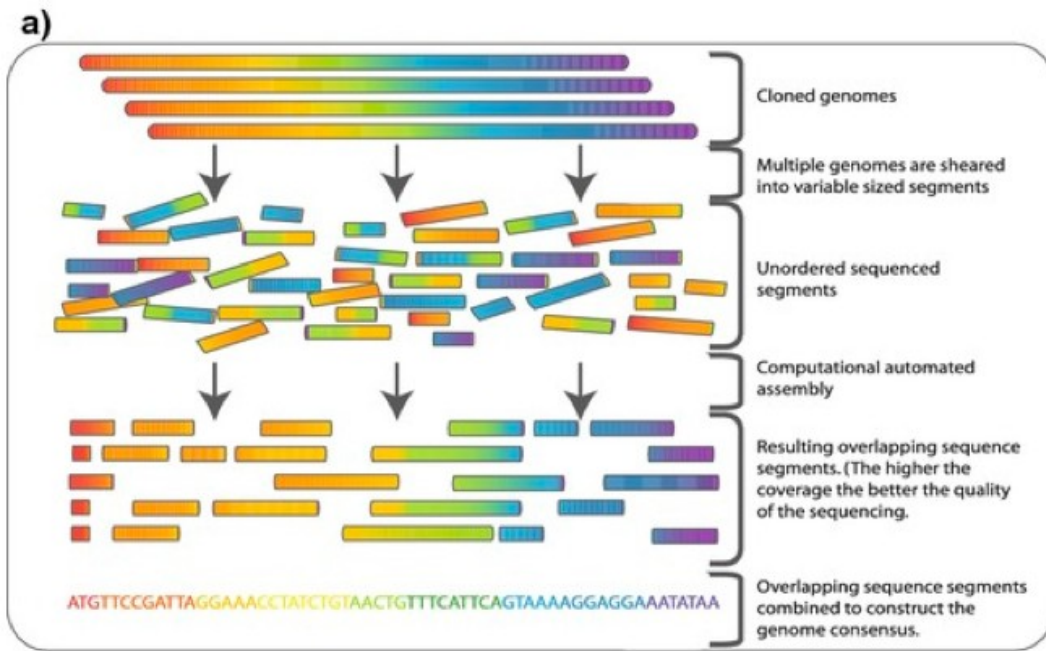


Základní požadavky pro úspěšné stanovení sekvence Sangerovým sekvenováním:

- ❖ **Příprava knihovny pro sekvenování** - DNA s přesně definovanými konci
 - s místem pro vazbu primeru
 - s koncovou značkou

Zajistit dostatečné pokrytí při čtení genomu

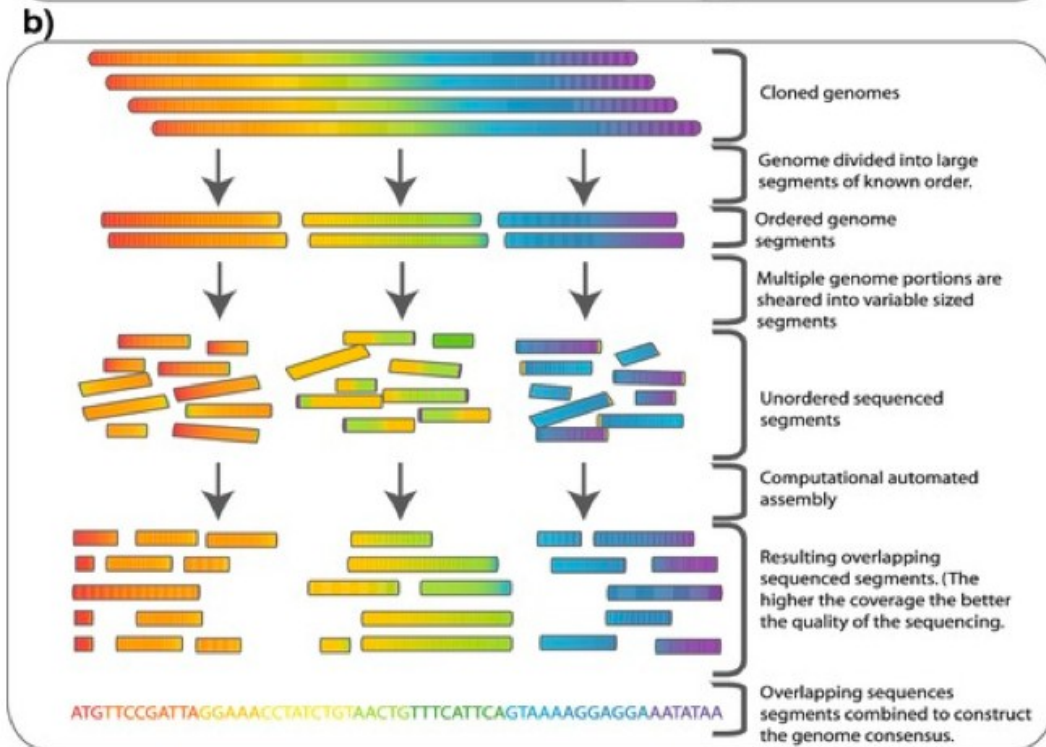
- ❖ Příprava variant fragmentů ssDNA lišících se svou délkou o jeden nukleotid
- ❖ Přesná separace těchto fragmentů na základě jejich délky, detekce připojené koncové báze, kontinuální čtení a detekce značených bází



Celogenomové
shotgun (náhodné)
sekvenování

versus

postupné shot-gun
sekvenování



Příprava knihovny pro Sangerovo sekvenování



Izolace DNA



Fragmentace 1300 – 2000 bp

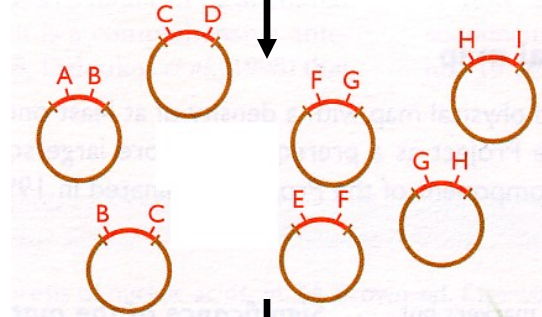


Vektor

+



Úprava konců a klonování



Sestavení překrývajících se klonů



Příprava knihovny pro náhodné sekvenování genomů

- Při náhodném sekvenování genomu jsou nejdříve připraveny mechanickým stříháním genomové DNA fragmenty s optimální velikostí (1 300 – 2 000 bp) a po úpravě jejich konců jsou nahodile naklonovány do vhodného vektoru za vzniku velkého počtu klonů.
- Ke štěpení DNA se využívá sonikace nebo pankreatická DNáza I za přítomnosti Mn^{2+} .

- Předpokládá se, že celková informace o sekvenci obsažená v připravených malých klonech odpovídá původní DNA a sekvence fragmentů jednotlivých klonů se vzájemně překrývají.
- Pomocí univerzálních sekvenačních primerů připojujících se k vektoru poblíž klonovacího místa jsou stanoveny sekvence krátkých úseků na koncích klonovaných fragmentů (minimálně 500 bází).
- Stanovené sekvence jsou pak použity k uspořádání klonovaných fragmentů z jednotlivých vektorů do souvislých sekvencí genomové DNA - kontigů.

Postup enzymatického sekvenování DNA

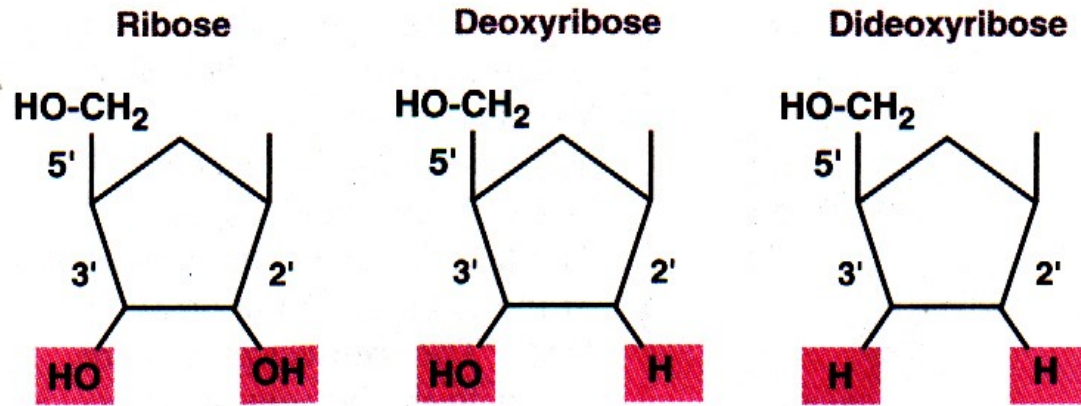
1. Příprava ssDNA jejíž sekvence má být stanovena
2. Rozdělení do 4 vzorků
3. Reakce s DNA polymerázou při níž se začlení do syntetizované DNA místo normálního deoxyribonukleosidtrifosfátu jeho analog, který působí jako koncový inhibitor syntézy DNA - dideoxynukleosidtrifosfát (ddNTP). V každém ze 4 vzorků vzniknou fragmenty, které jsou zakončeny příslušným ddNTP (ddCTP, ddGTP, ddATP a ddTTP).

Reakce obsahuje:

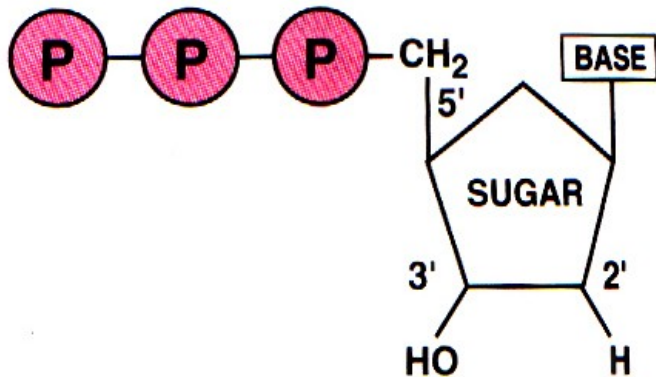
- molekulu DNA
- značený primer při pojující se k části molekuly DNA (místo odkud začínáme stanovovat sekvenci)
- směs obsahující 4 normální nukleotidy
- jeden ddNTP (v každém ze 4 vzorků je jiný)
- DNA polymerázu

4. Denaturace produktů
5. Elektroforetická separace umožňující oddělení fragmentů lišících se délkou o jednu bázi
6. Detekce fragmentů, které nesou označený konec

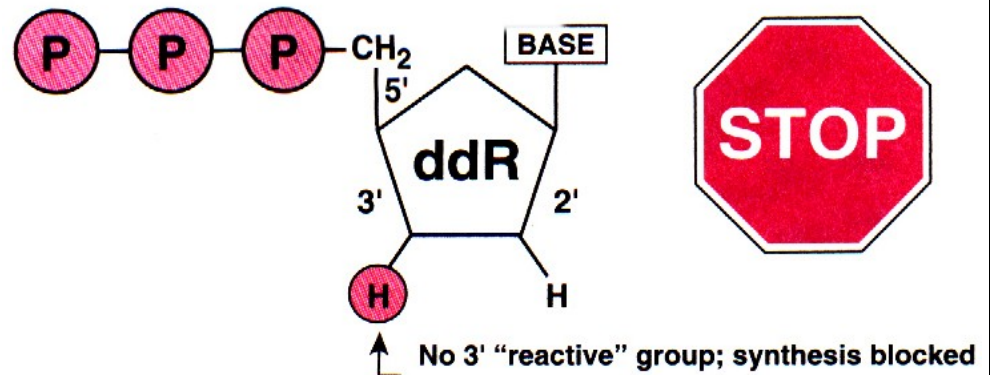
Dideoxynukleotidy nemají hydroxyl na 3'-konci



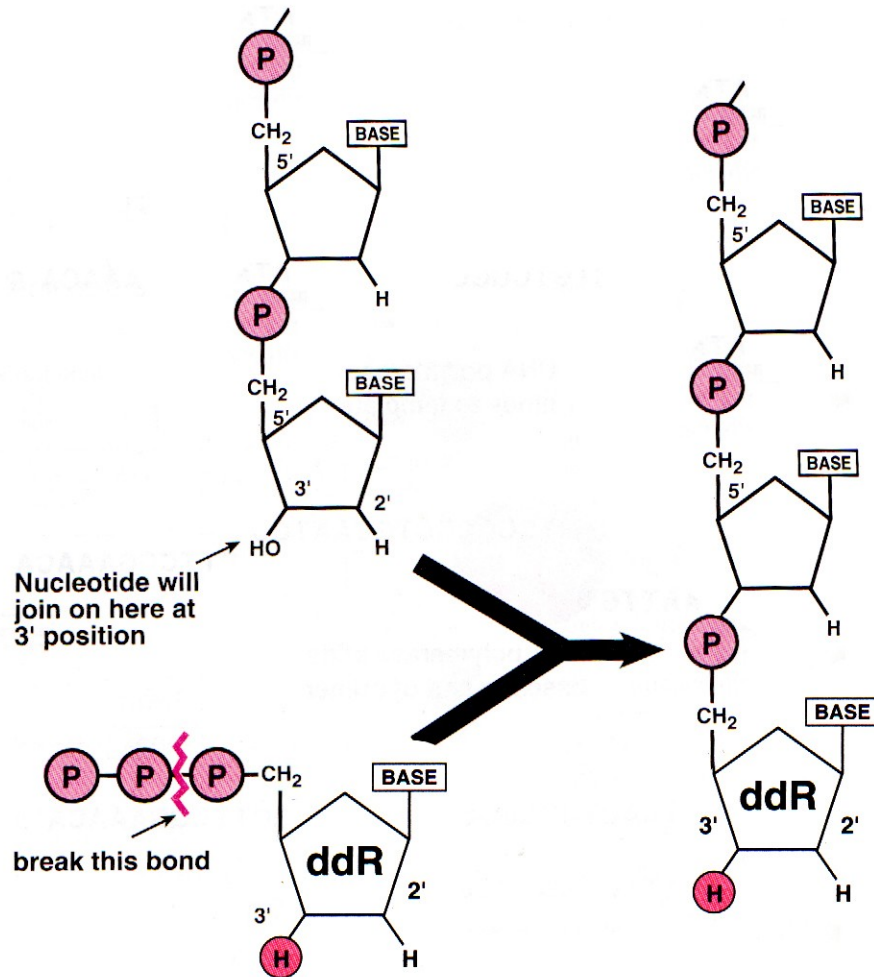
23.4 DEOXYNUCLEOSIDE TRIPHOSPHATE



23.7 DIDEOXYRIBOSE BLOCKS ELONGATION



Pokud je
dideoxynukleotid
inkorporován do
syntetizujícího se
řetězce, působí
jako terminátor
reakce



Replikace DNA s normálními deoxynukleotidy

Původní sekvence

A G C C T G G C G A C C A T C G T
T C G G A C C G C T G G T A G C A

Denaturovaný templátový řetězec

3' A G C C T G G C G A C C A T C G T 5'

Prfektní kopie

A G C C T G G C G A C C A T C G T
T C G G A C C G C T G G T A G C A

Co se stane pokud při reakci použijete směs dGTP a ddGTP?

Původní sekvence

A G C C T G G C G A C C A T C G T
T C G G A C C G C T G G T A G C A

Templátový řetězec

3' A G C C T G G C G A C C A T C G T 5'

Perfektní kopie

~~A G C C T G G C G A C C A T C G T
T C G G A C C G C T G G T A G C A~~

Směs řetězců ukončených GUANINEM
při použití směsi dGTP a ddGTP

T C G
T C G G
T C G G A C C G
T C G G A C C G C T G
T C G G A C C G C T G G
T C G G A C C G C T G G T A G

(C)

5' GCATATGTCAGTCCAG 3'
3' CGTATACAGTCAGGTC 5' } dvouřetězcová DNA

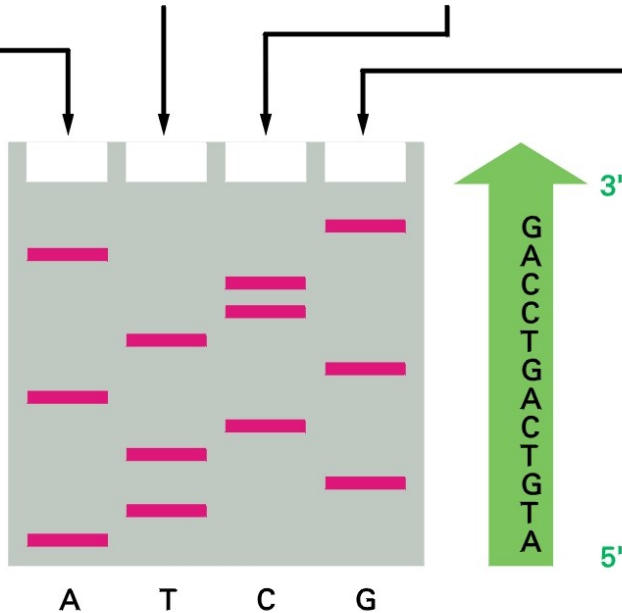
označený primer

5' GCAT 3'
3' CGTATACAGTCAGGTC 5' } jednořetězcová DNA

+ nadbytek dATP
dTTP
dCTP
dGTP

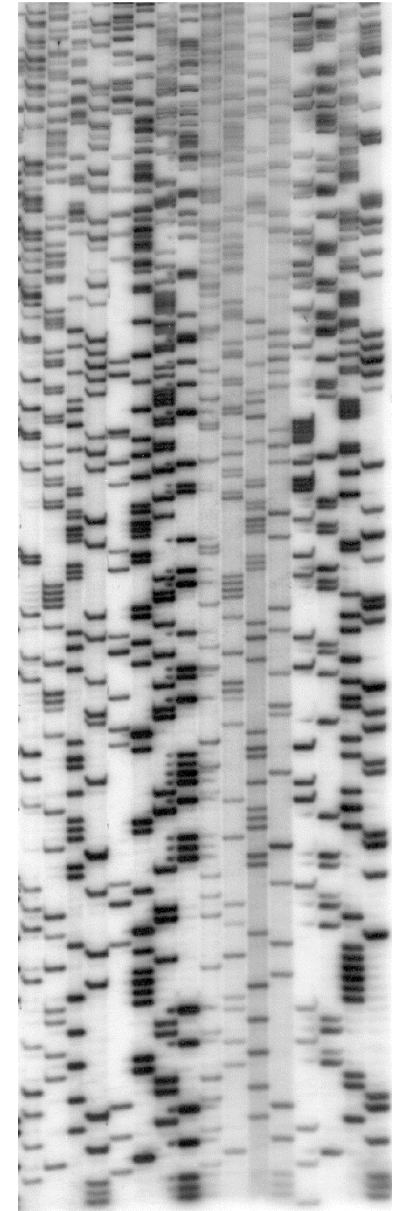
+ ddATP + DNA-polymeráza + ddTTP + DNA-polymeráza + ddCTP + DNA-polymeráza + ddGTP + DNA-polymeráza

GCAT A GCAT AT GCAT ATGTC GCAT ATG
GCAT ATGTCA GCAT ATGT GCAT ATGTCAGTC GCAT ATGTCAG
GCAT ATGTCAGTCCA GCAT ATGTCAGT GCAT ATGTCAGTCC GCAT ATGTCAGTCCAG



[seq4.mov](#)

Obraz autoradiogramu ze sekvenačního gelu



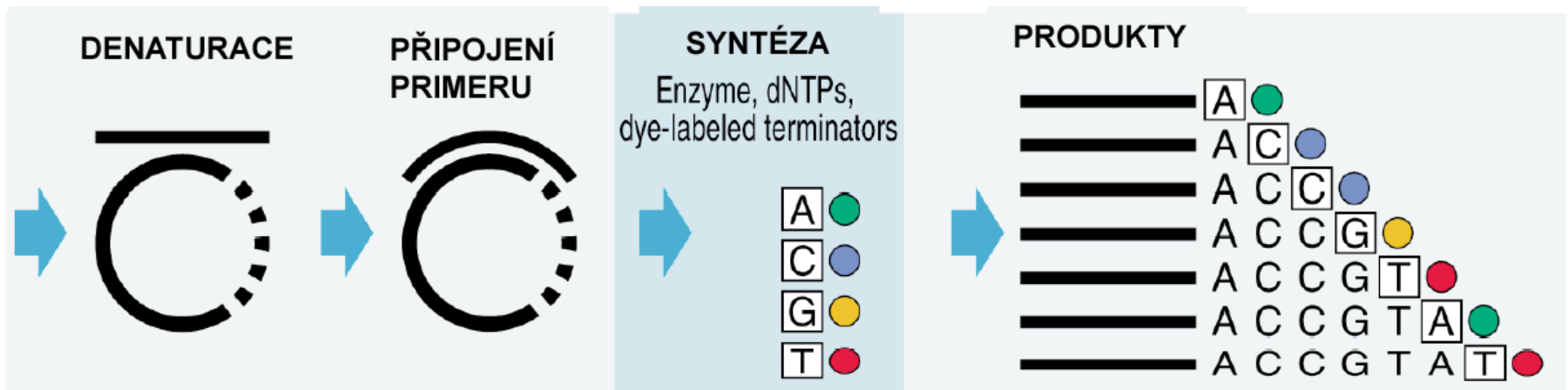
ATGC ATGC ATGC ATGC

Automatické sekvenování DNA

- Je variantou enzymatického sekvenování DNA.
- Syntéza DNA probíhá v jedné reakci
- Ke značení produktů se používají čtyřmi různými fluorescenčními značkami označené
 - primery
 - dideoxyribonukleotidy

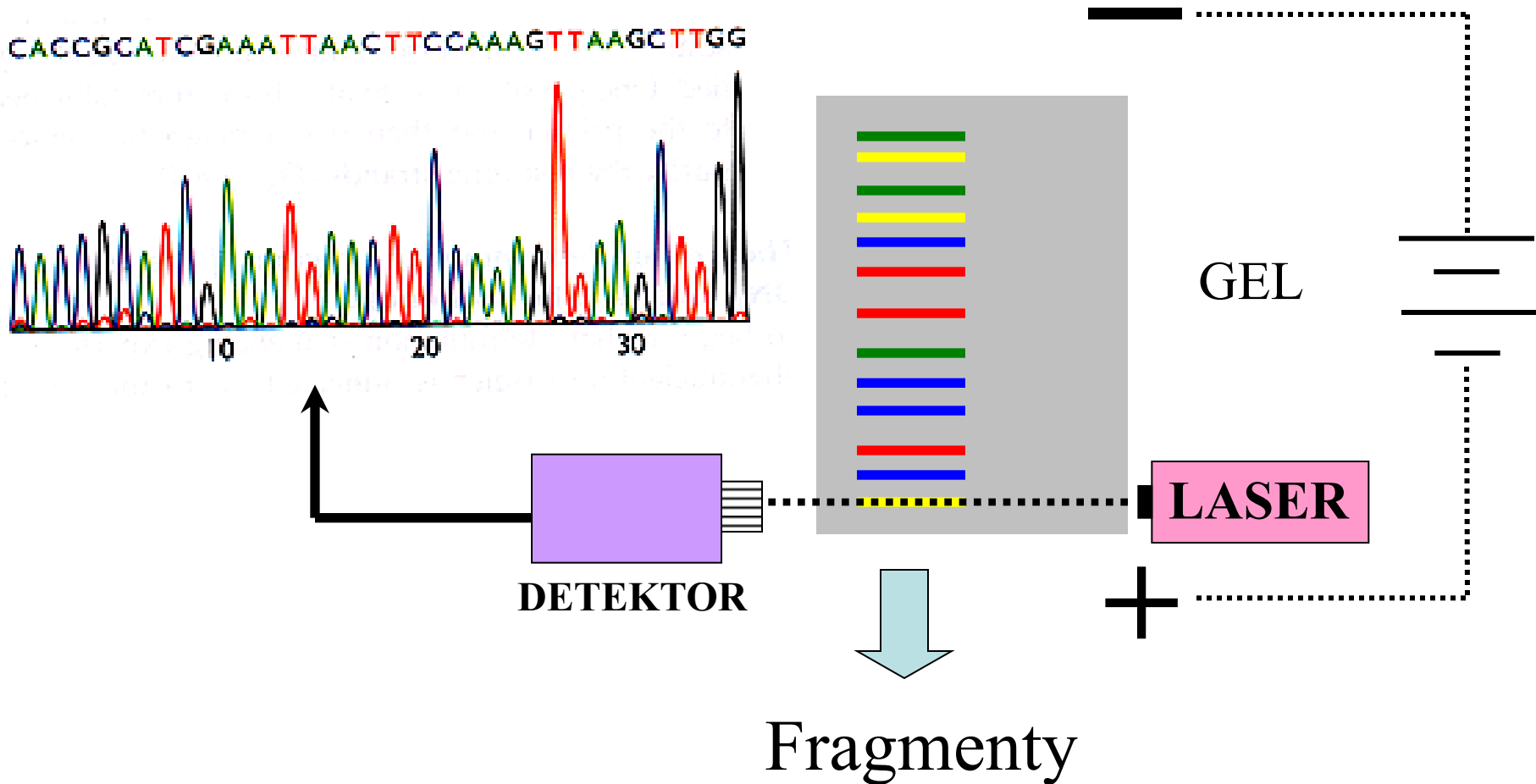
Strategie barevných terminátorů

asymetrická PCR

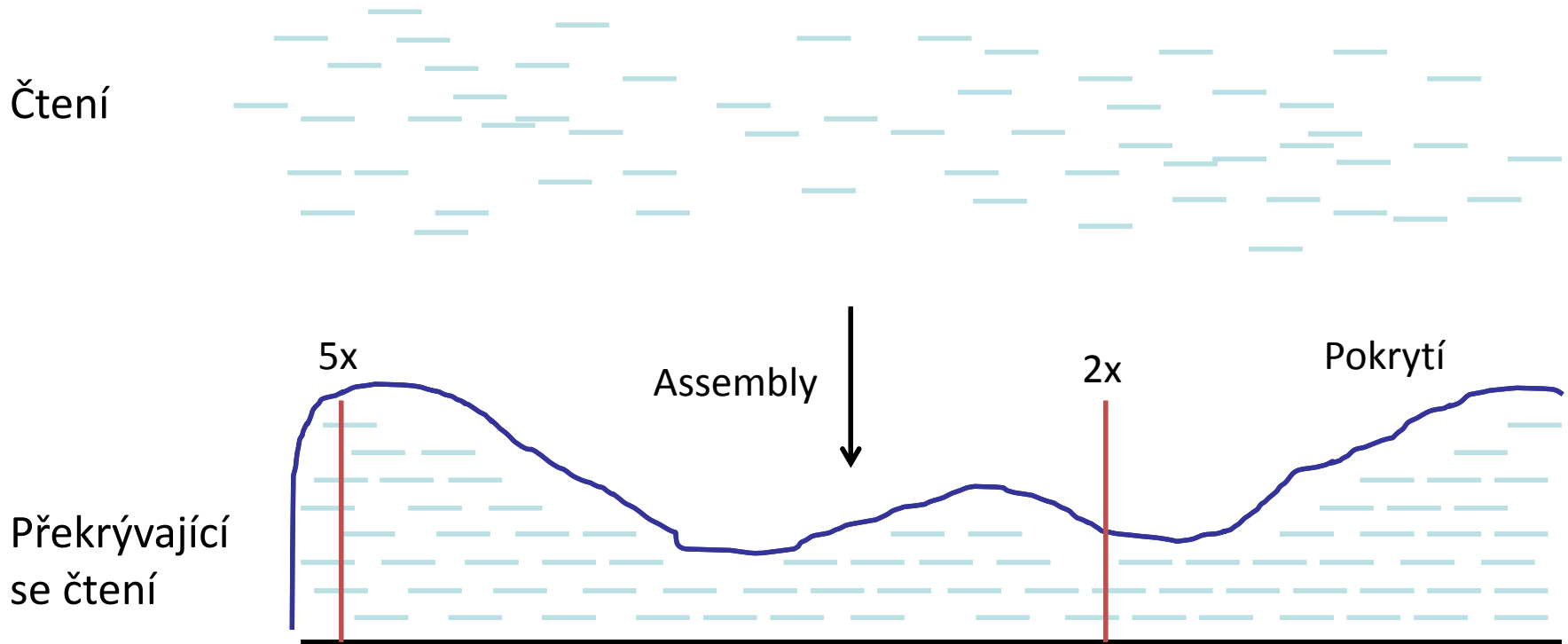


Princip detekce produktů

- Detekce produktů probíhá během elektroforézy pomocí laserového detektoru (laserem indukovaná fluorescence, LIF) napojeného na počítač, který vyhodnocuje sekvenci.



Assembly



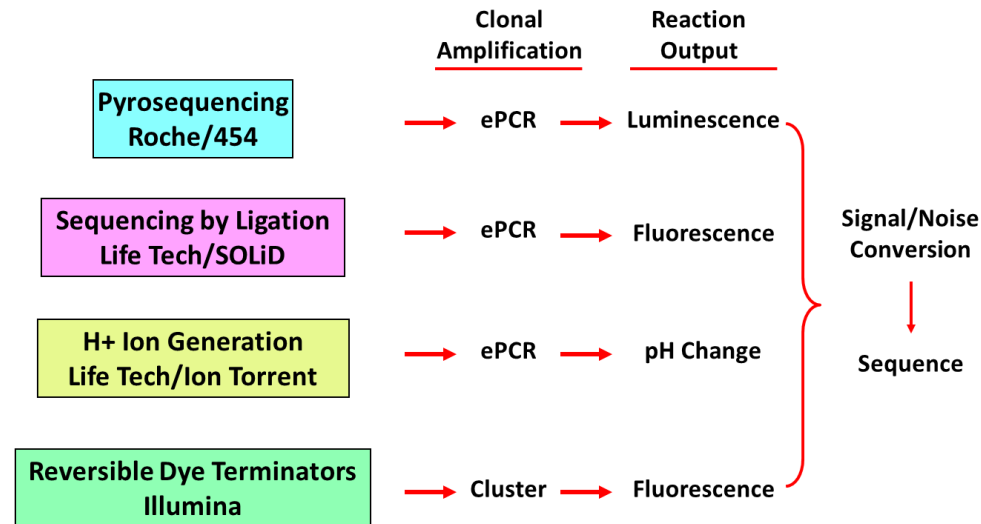
- Kontig – kontinuální sekvence vzniklá spojením více překrývajících se čtení
- Konsenzní sekvence = kontigy -> genom
- Pokrytí na bázi
- Hloubka sekvenování = celkové pokrytí (počet získaných čtení \times průměrná délka čtení)/velikost genomu

Uspořádané sekvenování

- Pro doplnění sekvence mezer zbývajících po náhodném sekvenování
- Pro sekvenování malých fragmentů DNA
- Dva odlišné přístupy:
 - **procházení primerem**
 - vyžaduje znalost sekvence, ke které se připojuje primer, který umožní prodloužení řetězce DNA-polymerázou.
 - získaná sekvence z první reakce je použita pro návrh primeru pro další reakci a tento krok se opakuje, dokud není dosaženo kompletního stanovení sekvence.
 - Tento proces nevyžaduje další klonování a minimalizuje stanovení nadbytečných sekvencí, ale správnost stanovené sekvence by měla být ověřena sekvenováním **obou řetězců**.
 - **postupné zkracování fragmentu exonukleázou a tvorba sousedících delecí**

Metody sekvenování nové generace (next generation sequencing, NGS)

- Liší se v provedení a chemii
- V základu se podobají v sekvenování tisíců až miliónů klonálně amplifikovaných molekul (masivní paralelní sekvenování)
- Probíhá vývoj technik
 - Více čtení
 - Delší čtení
 - Rychlejší sekvenování
 - Nižší cena
- Nové aplikace v klinické oblasti, vývoj kitů cílených na určité části genomů (dědičná onemocnění, nádorová onemocnění, metagenomika, 16S rRNA)

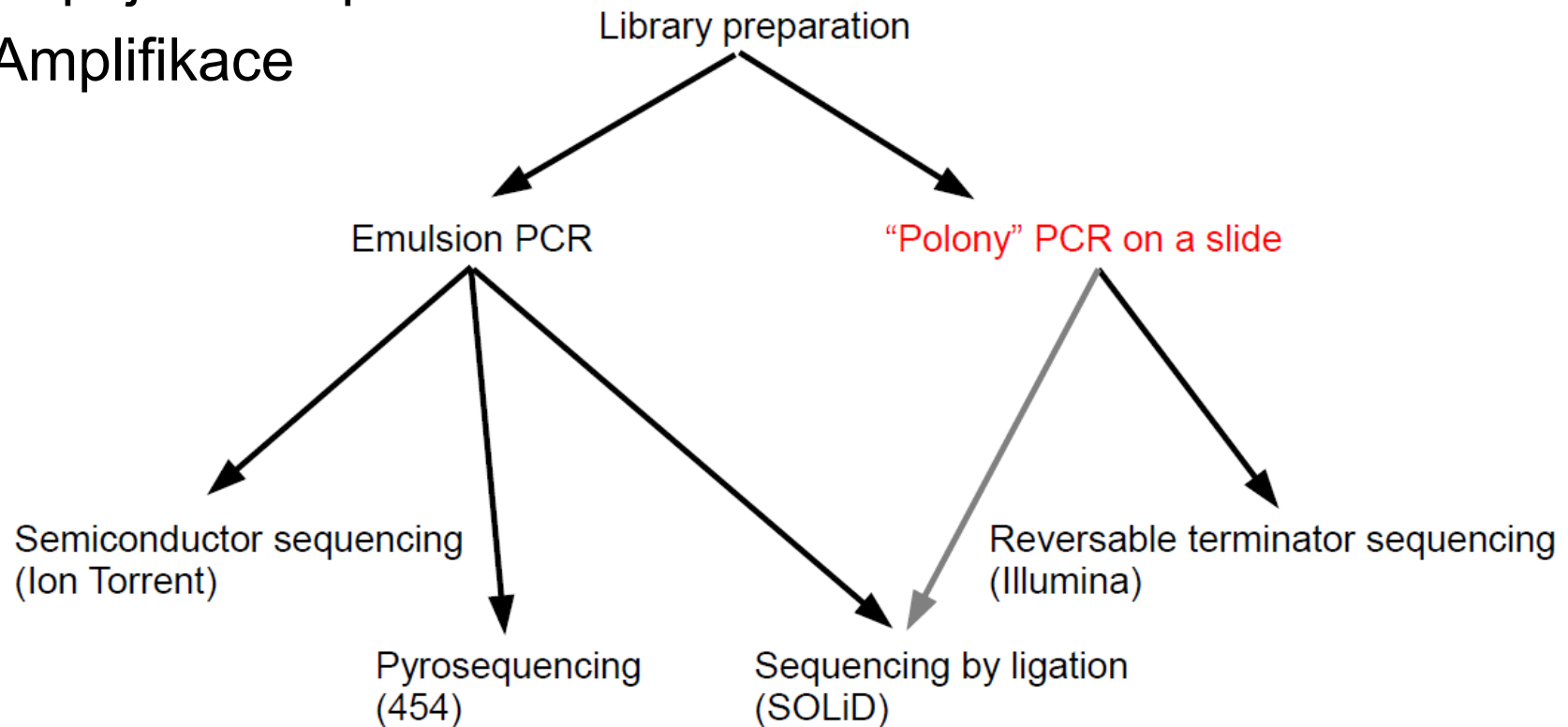


• Sekvenování třetí generace

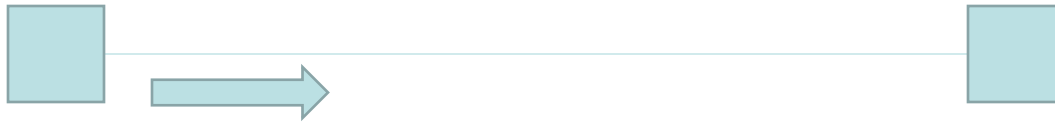
- Pacific Biosciences
- Helicos Biosciences
- NABsys
- VisiGen Biotechnologies
- Oxford Nanophore Technologies

Metody přípravy knihovny

- Fragmentace
 - Enzymatická
 - Fyzikální (sonikace, nebulizace, Hydroshear)
- Připojení adaptorů
- Amplifikace



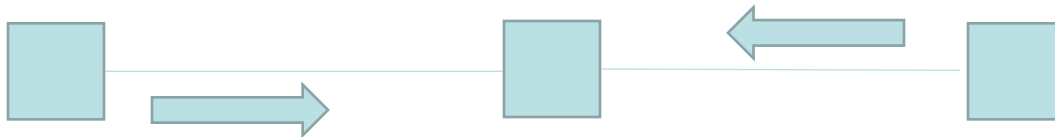
Typy uspořádání NGS sekvenování



Single Read



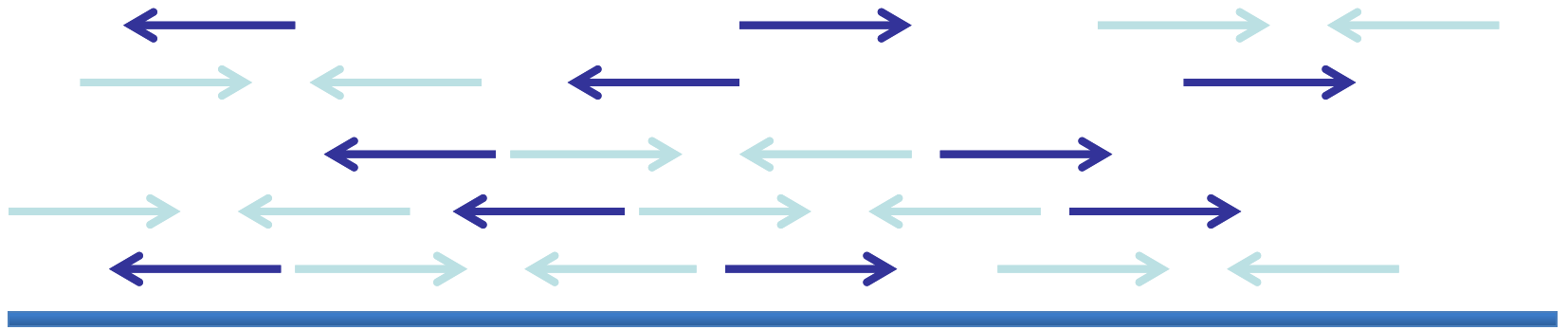
Paired-end read (PE)



Mate-pair read (MP)

výsledkem jsou miliony krátkých čtení sekvencí z náhodných částí genomu

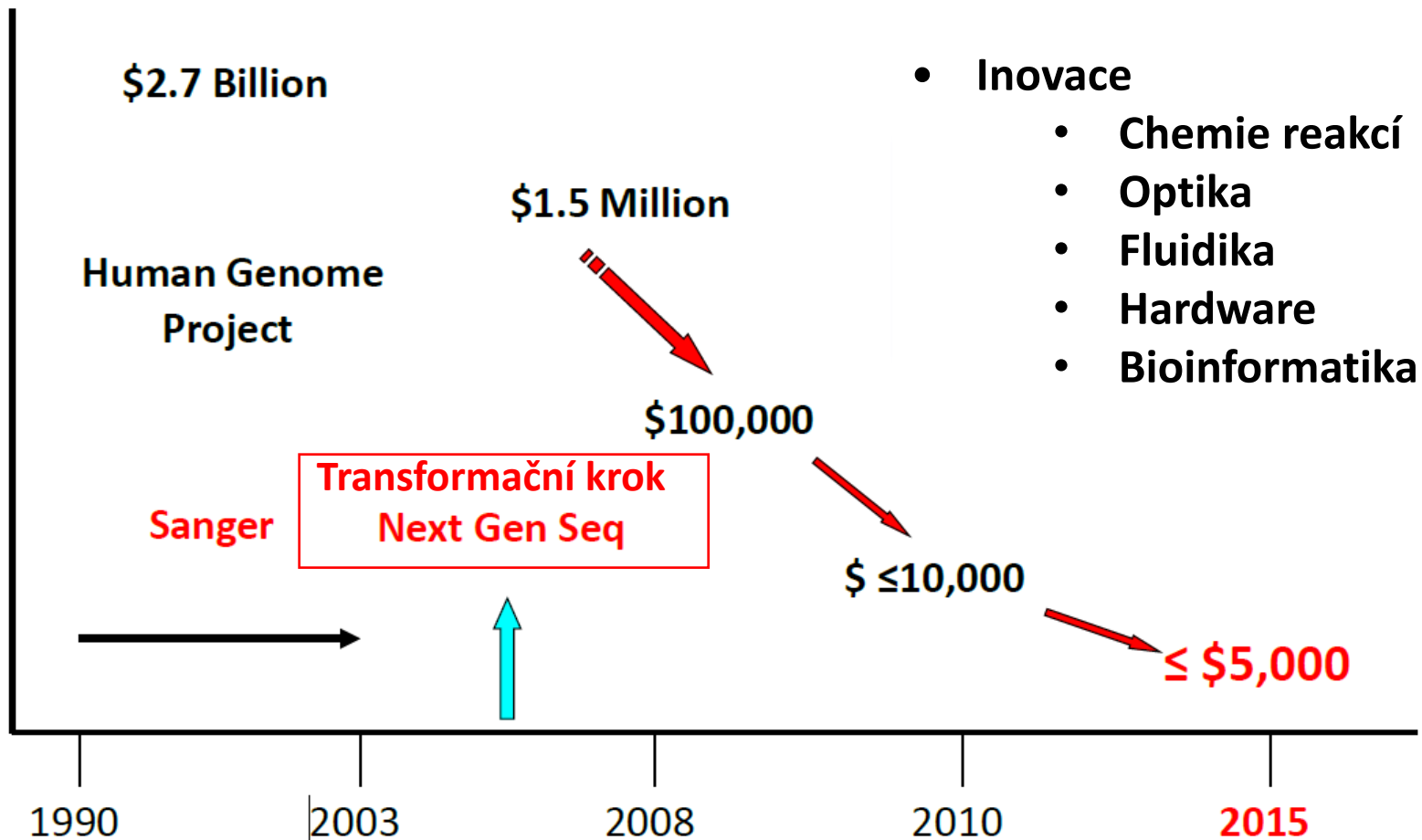
Orientace párových čtení



→ ← Paired end (PE) reads

← → Mate pair (MP) reads

Vývoj ceny sekvenování na příkladu HGP



Genetický analyzátor ABI 3100

Soustava
kapilár

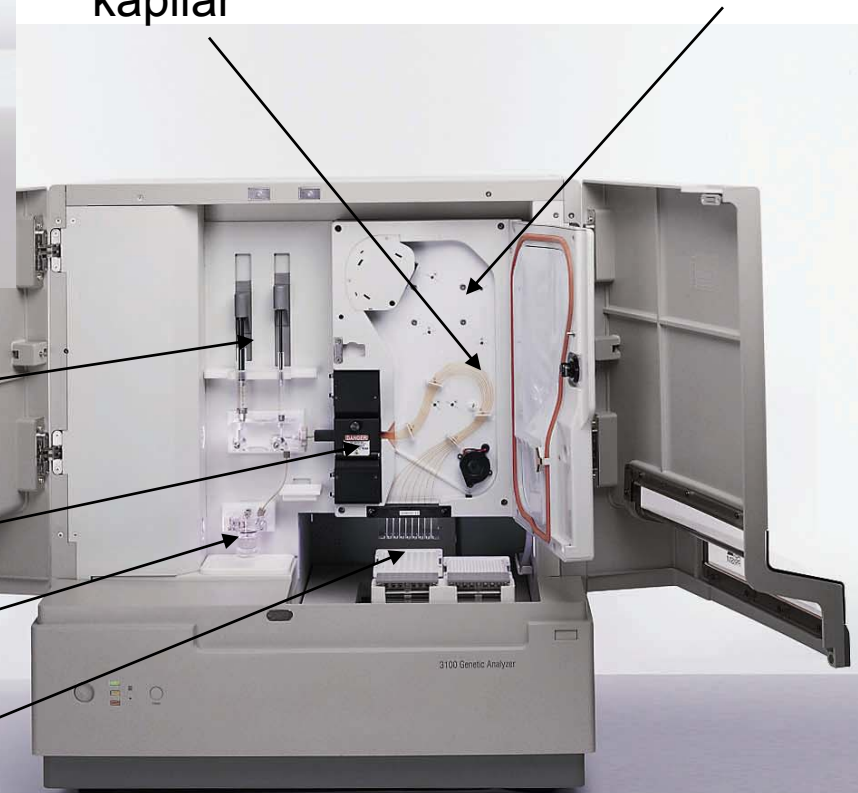
Vyhřívaná deska

Příprava gelu

Laserový detektor

Rezervoár pufru

Automatické nanášení vzorku



Sekvenátory Miseq a IonPGM



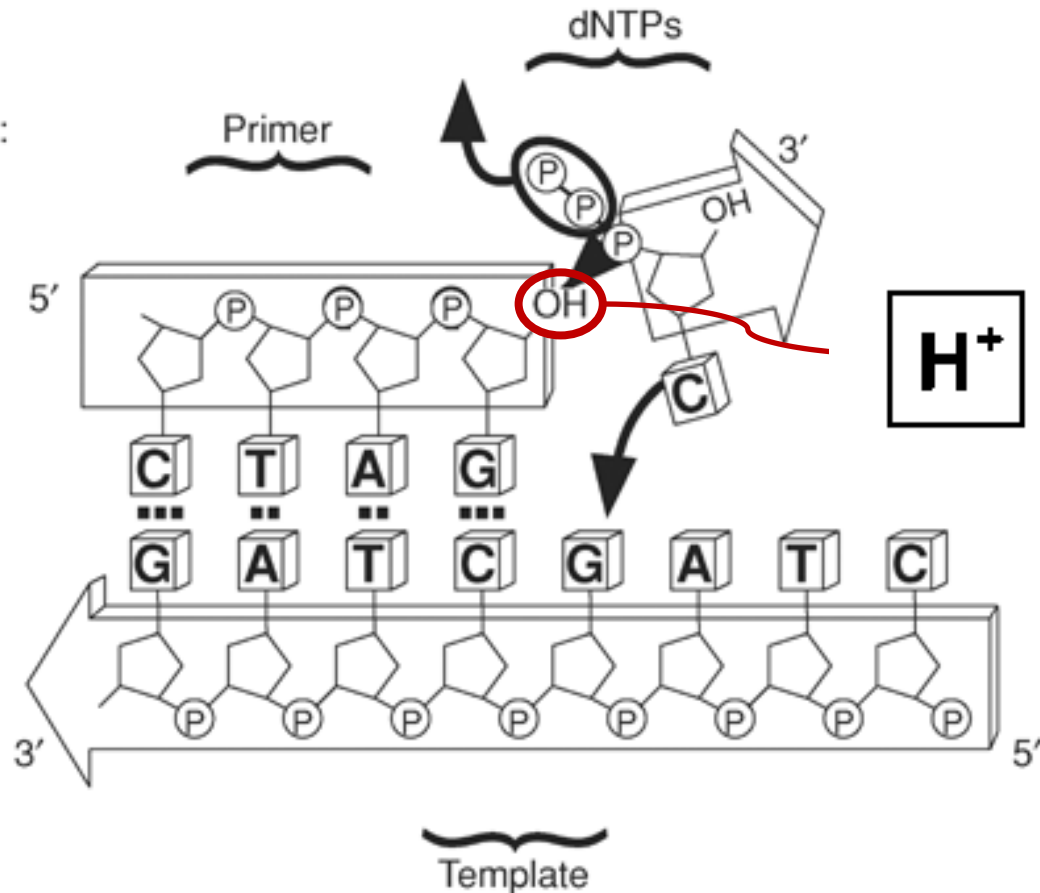
Ion Torrent polovodičové sekvenování

- prvním sekvenátor DNA, který **nepoužívá pro detekci sekvenovaných bází DNA světelný signál, který by byl uvolňovaný při enzymatických reakcích s fluorescenčními nebo chemiluminescenčními substráty.**
- Sekvenování Ion Torrent je založené na elektrochemické detekci vodíkových iontů (pH) které jsou uvolněny při replikaci sekvenovaného templátu na speciálním polovodičovém čipu.

Uvolnění vodíku v nepufřujících podmínkách

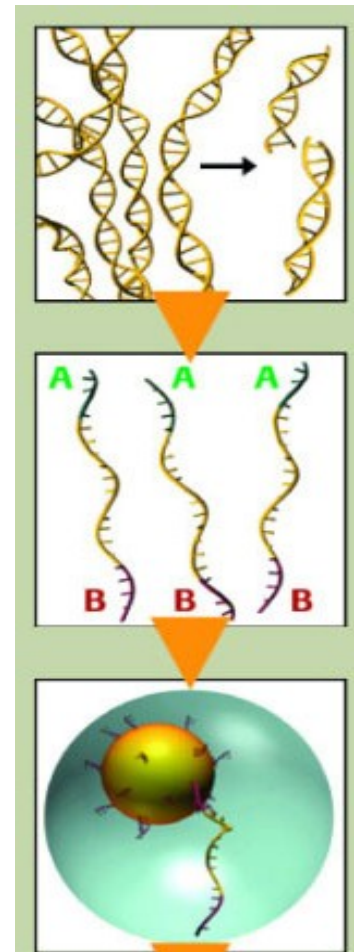


Example:



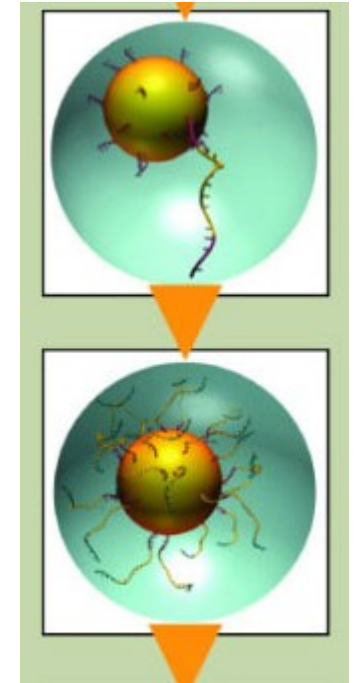
Knihovna

- Příprava jednořetězcové DNA knihovny
 - Umožňuje zpracovat různé typy vzorků
 - genomové DNA
 - produkty PCR
 - BACs
 - cDNA
 - Frakcionace dlouhých úseků na 200- až 400-bp dlouhé fragmenty
 - Vazba dvou adaptorů specifických pro 3'- a 5'- konce na každý fragment
 - Adaptor A obsahuje vazebné místo pro primer
 - Adaptor B B obsahuje 5'-biotinovou značku, která slouží k imobilizaci DNA knihovny na mikrosféry pokryté streptavidinem



Klonální amplifikace knihovny emulzní PCR

- Klonální amplifikace knihovny
 - **emulzní PCR**, amolifikační reagensie ve směsi voda-olej → mikroreaktory obsahující jedinou kuličku s unikátním fragmentem DNA z knihovny - (10^7) kopií
- Separace kuliček a výběr pouze těch, které obsahují amplifikovanou DNA (enrichment)
- Sekvenační reakce
- Analýza dat a assembly



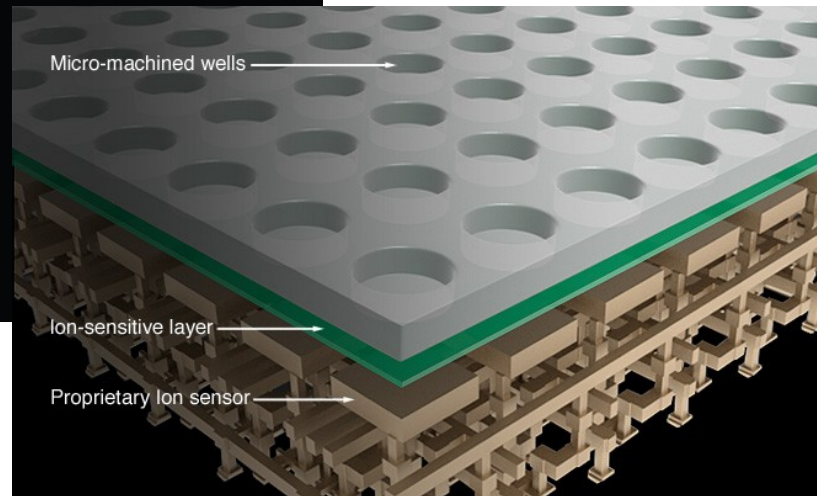
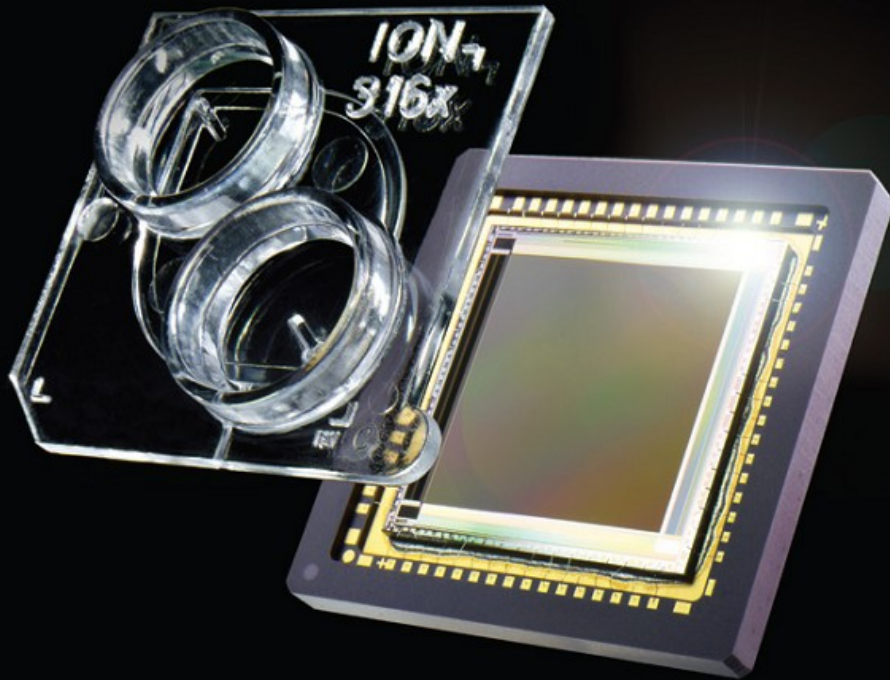
IonTorrent polovodičové sekvenování

- Na čipu se nachází milióny jednotlivých reakčních cell (reaktorů), ve kterých probíhá sekvenační analýza individuálních kopií DNA na základě kontinuálního střídání reakčních složek (jednotlivých typů nukleotidů) v mikrofluidním systému.
- DNA imobilizovaná na mikrosférách (po emulzní PCR)
- Kapacita závisí na typu použitého polovodičového chipu
 - 10 – 65 miliónů
 - 100 – 600 miliónů
 - > 1000 miliónů

Ion Torrent polovodičové sekvenování

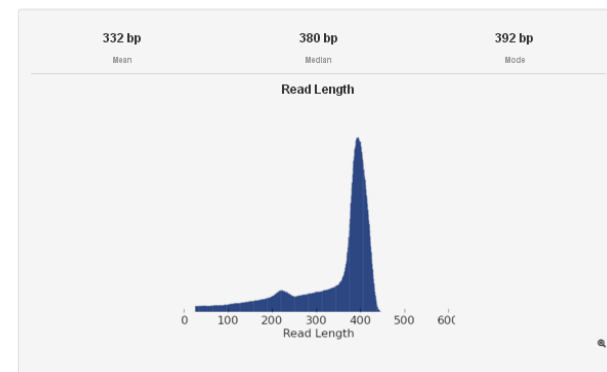
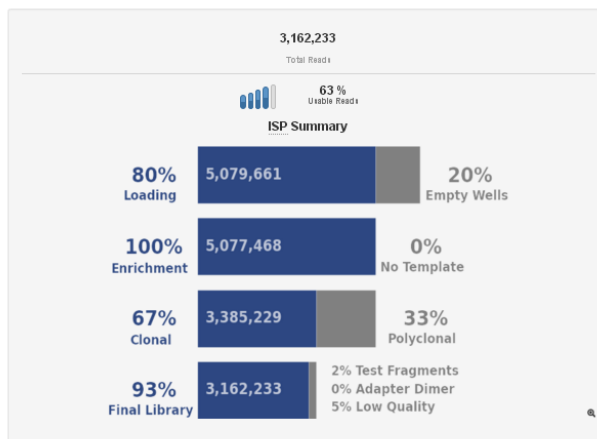
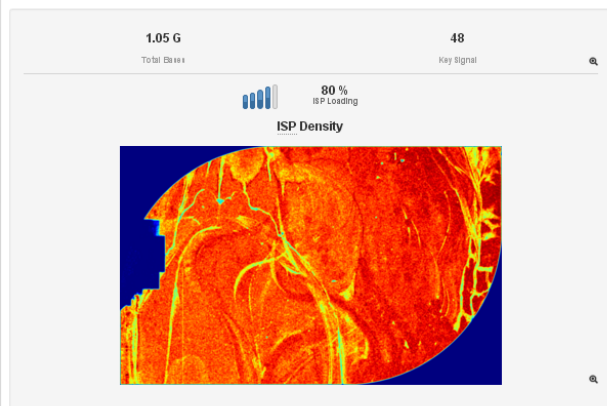
- Technologie Ion Torrentu je otevřená pro sekvenování DNA de-novo i cílené sekvenování vybraných oblastí genomu
- Minimální délka sekvenačního čtení
 - V jedno směru: 400bp
 - Obousměrné (Paired end)
 - Počet vzorků analyzovaných v jednom běhu
 - až 96 vzorků – pomocí označení tzv. barkodem
- Doba sekvenační analýzy
 - 2 - 3,5 hodiny – podle použitého čipu

IonTorrent čip

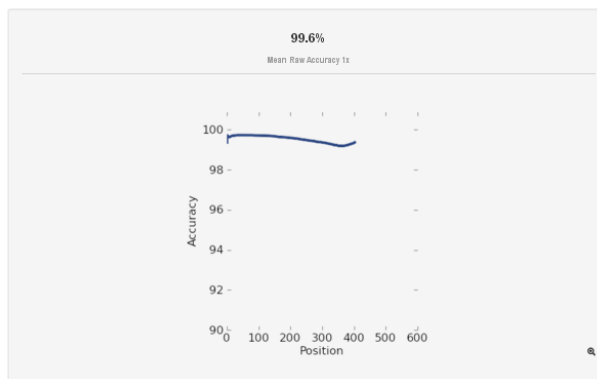
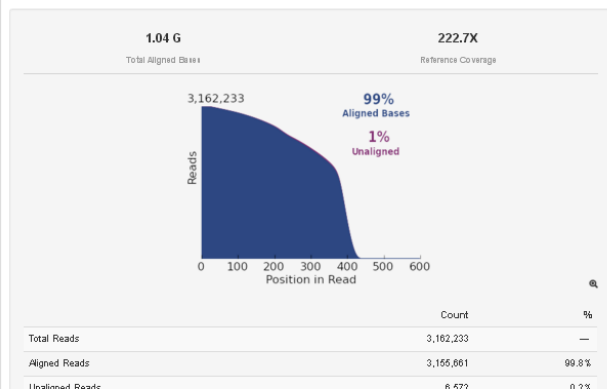


Výstup z Torrent server

Read Summary: Unaligned



Aligned to E. coli DH10B



1.03 G AQ17 Total Bases

Alignment Quality

	AQ17	AQ20	Perfect
Total Number of Bases [bp]	1.03 G	1 G	780 M
Mean Length [bp]	332	325	259
Longest Alignment [bp]	499	499	472
Mean Coverage Depth [x]	220.3	213.8	166.4

GS De novo Assembler

Ready for analysis

Project: Stafal [Genomic]
Location: /home/LMDM/Plocha/analyza/Stafal

Overview Project Parameters Result files Alignment results Flowgrams

Contig ▲	Bases
contig00001	20 149
contig00002	18 049
contig00003	14 160
contig00004	11 926
contig00005	8 637
contig00006	7 994
contig00007	6 816
contig00008	6 697
contig00009	4 476
contig00010	3 326
contig00011	3 095
contig00012	3 014
contig00013	2 722
contig00014	2 690
contig00015	2 383
contig00016	2 329
contig00017	2 191
contig00018	2 036
contig00019	1 499
contig00020	1 352
contig00021	1 166
contig00022	1 050
contig00023	1 016
contig00024	948
contig00025	770

Contig: contig00001 - 20 149 bp.

Base left selected right

2 032 --- 2 132

contig00001 TCTTCTCCTAAAAACCC-TAAAGTATCAAGG-TTTTT-ACAAACCTCTACATT-AGGTAAGT-AACCGAAAGGTTCTATACTAGAATCTGTATATAAACTATTTGT
HK6IEBF01BN89B TCTTCTCCTAAAAACCC-TAAAGTATCAAGG-TTTTT-ACAAACCTCTACATT-AGGTAAGT
contig00007 TCTTCTCCTAAAAACCC-TAAAGTATCAAGG-TTTTT-ACAAACCTCTACATT-AGGTAAGT
HK6IEBF01A3HAV TCTTCTCCTAAAAACCC-TAAAGTATCAAGG-TTTTT-ACAAACCTCTACATT-AGGTAAGT-AACCGAAAGGTTCTATACTAGAATCTGTATATAAACTATTTGT
contig00008 HK6IEBF01BHKX2 TCTTCTCCTAAAAACCC-TAAAGTATCAAGG-TTTTT-ACAAACCTCTACATT-AGGTAAGT-AACCGAAAGGTTCTATACTAGAATCTGTATATAAACTATTTGT
contig00009 HK6IEBF01A5TH1 TCTTCTCCTAAAAACCC-TAAAGTATCAAGG-TTTTT-ACAAACCTCTACATT-AGGTAAGT-AACCGAAAGGTTCTATACTAGAATCTGTATATAAACTATTTGT
contig00010 HK6IEBF01AHUA1 TCTTCTCCTAAAAACCC-TAAAGTATCAAGG-TTTTT-ACAAACCTCTACATT-AGGTAAGT-AACCGAAAGGTTCTATACTAGAATCTGTATATAAACTATTTGT
contig00011 HK6IEBF01BKM7X TCTTCTCCTAAAAACCC-TAAAGTATCAAGG-TTTTT-ACAAACCTCTACATT-AGGTAAGT-AACCGAAAGGTTCTATACTAGAATCTGTATATAAACTATTTGT
contig00012 HK6IEBF01AV175 TCTTCTCCTAAAAACCC-TAAAGTATCAAGG-TTTTT-ACAAACCTCTACATT-AGGTAAGT-AACCGAAAGGTTCTATACTAGAATCTGTATATAAACTATTTGT
contig00013 HK6IEBF01BJY8L TCTTCTCCTAAAAACCC-TAAAGTATCAAGG-TTTTT-ACAAACCTCTACATT-AGGTAAGT-AACCGAAAGGTTCTATACTAGAATCTGTATATAAACTATTTGT
contig00014 HK6IEBF01BBYUP TCTTCTCCTAAAAACCC-TAAAGTATCAAGG-TTTTT-ACAAACCTCTACATT-AGGTAAGT-AACCGAAAGGTTCTATACTAGAATCTGTATATAAACTATTTGT
contig00015 HK6IEBF01AI6AG TCTTCTCCTAAAAACCC-TAAAGTATCAAGG-TTTTT-ACAAACCTCTACATT-AGGTAAGT-AACCGAAAGGTTCTATACTAGAATCTGTATATAAACTATTTGT
contig00016 HK6IEBF01AW7YG TCTTCTCCTAAAAACCC-TAAAGTATCAAGG-TTTTT-ACAAACCTCTACATT-AGGTAAGT-AACCGAAAGGTTCTATACTAGAATCTGTATATAAACTATTTGT
contig00017 HK6IEBF01B11E6 TCTTCTCCTAAAAACCC-TAAAGTATCAAGG-TTTTT-ACAAACCTCTACATT-AGGTAAGT-AACCGAAAGGTTCTATACTAGAATCTGTATATAAACTATTTGT
contig00018 HK6IEBF01AYV3H TCTTCTCCTAAAAACCC-TAAAGTATCAAGG-TTTTT-ACAAACCTCTACATT-AGGTAAGT-AACCGAAAGGTTCTATACTAGAATCTGTATATAAACTATTTGT
contig00019 HK6IEBF01BN288 TCTTCTCCTAAAAACCC-TAAAGTATCAAGG-TTTTT-ACAAACCTCTACATT-AGGTAAGT-AACCGAAAGGTTCTATACTAGAATCTGTATATAAACTATTTGT
contig00020 HK6IEBF01BG5KV TCTTCTCCTAAAAACCC-TAAAGTATCAAGG-TTTTT-ACAAACCTCTACATT-AGGTAAGT-AACCGAAAGGTTCTATACTAGAATCTGTATATAAACTATTTGT
contig00021 HK6IEBF01BJFDR TCTTCTCCTAAAAACCC-TAAAGTATCAAGG-TTTTT-ACAAACCTCTACATT-AGGTAAGT-AACCGAAAGGTTCTATACTAGAATCTGTATATAAACTATTTGT
contig00022 HK6IEBF01B04U2 TCTTCTCCTAAAAACCC-TAAAGTATCAAGG-TTTTT-ACAAACCTCTACATT-AGGTAAGT-AACCGAAAGGTTCTATACTAGAATCTGTATATAAACTATTTGT
contig00023 HK6IEBF01A39J2 TCTTCTCCTAAAAACCC-TAAAGTATCAAGG-TTTTT-ACAAACCTCTACATT-AGGTAAGT-AACCGAAAGGTTCTATACTAGAATCTGTATATAAACTATTTGT
contig00024 HK6IEBF01BSDDB TCTTCTCCTAAAAACCC-TAAAGTATCAAGG-TTTTT-ACAAACCTCTACATT-AGGTAAGT-AACCGAAAGGTTCTATACTAGAATCTGTATATAAACTATTTGT
contig00025 HK6IEBF01BBQRL TCTTCTCCTAAAAACCC-TAAAGTATCAAGG-TTTTT-ACAAACCTCTACATT-AGGTAAGT-AACCGAAAGGTTCTATACTAGAATCTGTATATAAACTATTTGT
contig00026 HK6IEBF01BBGE9 TCTTCTCCTAAAAACCC-TAAAGTATCAAGG-TTTTT-ACAAACCTCTACATT-AGGTAAGT-AACCGAAAGGTTCTATACTAGAATCTGTATATAAACTATTTGT
contig00027 HK6IEBF01B1K98 TCTTCTCCTAAAAACCC-TAAAGTATCAAGG-TTTTT-ACAAACCTCTACATT-AGGTAAGT-AACCGAAAGGTTCTATACTAGAATCTGTATATAAACTATTTGT
contig00028 HK6IEBF01AXRBZ TCTTCTCCTAAAAACCC-TAAAGTATCAAGG-TTTTT-ACAAACCTCTACATT-AGGTAAGT-AACCGAAAGGTTCTATACTAGAATCTGTATATAAACTATTTGT
contig00029 HK6IEBF01AG81V TCTTCTCCTAAAAACCC-TAAAGTATCAAGG-TTTTT-ACAAACCTCTACATT-AGGTAAGT-AACCGAAAGGTTCTATACTAGAATCTGTATATAAACTATTTGT
contig00030 HK6IEBF01BWH8V TCTTCTCCTAAAAACCC-TAAAGTATCAAGG-TTTTT-ACAAACCTCTACATT-AGGTAAGT-AACCGAAAGGTTCTATACTAGAATCTGTATATAAACTATTTGT
contig00031 HK6IEBF01AV2R6 TCTTCTCCTAAAAACCC-TAAAGTATCAAGG-TTTTT-ACAAACCTCTACATT-AGGTAAGT-AACCGAAAGGTTCTATACTAGAATCTGTATATAAACTATTTGT

Exit
New
Open
Start
Stop
About
Help

base:
read:
val:

Info Stafal: Opened Assembler project: /home/LMDM/Plocha/analyza/Stafal

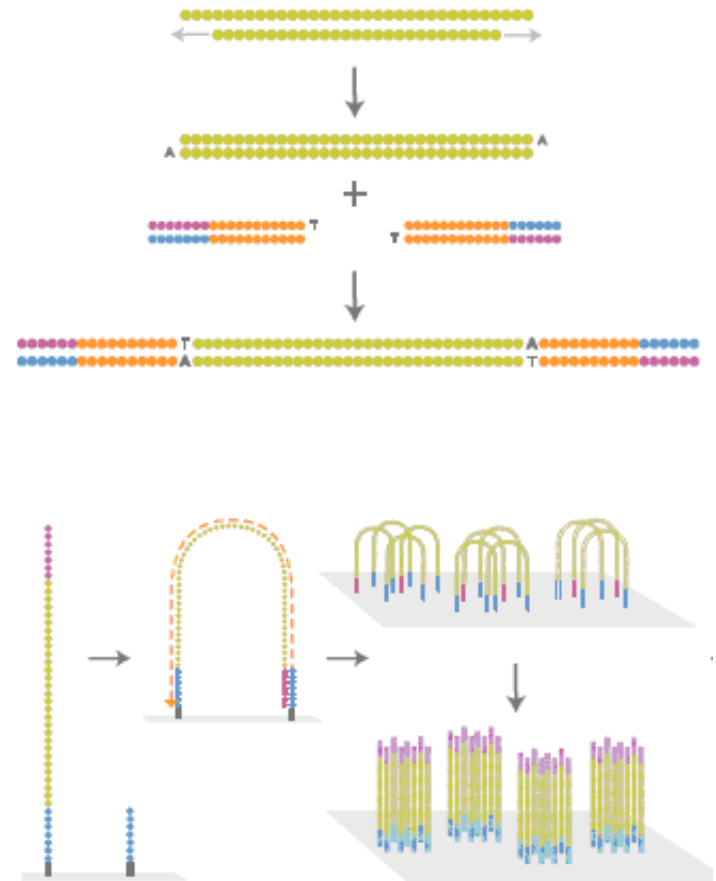
Analysis messages

Technologie firmy Illumina

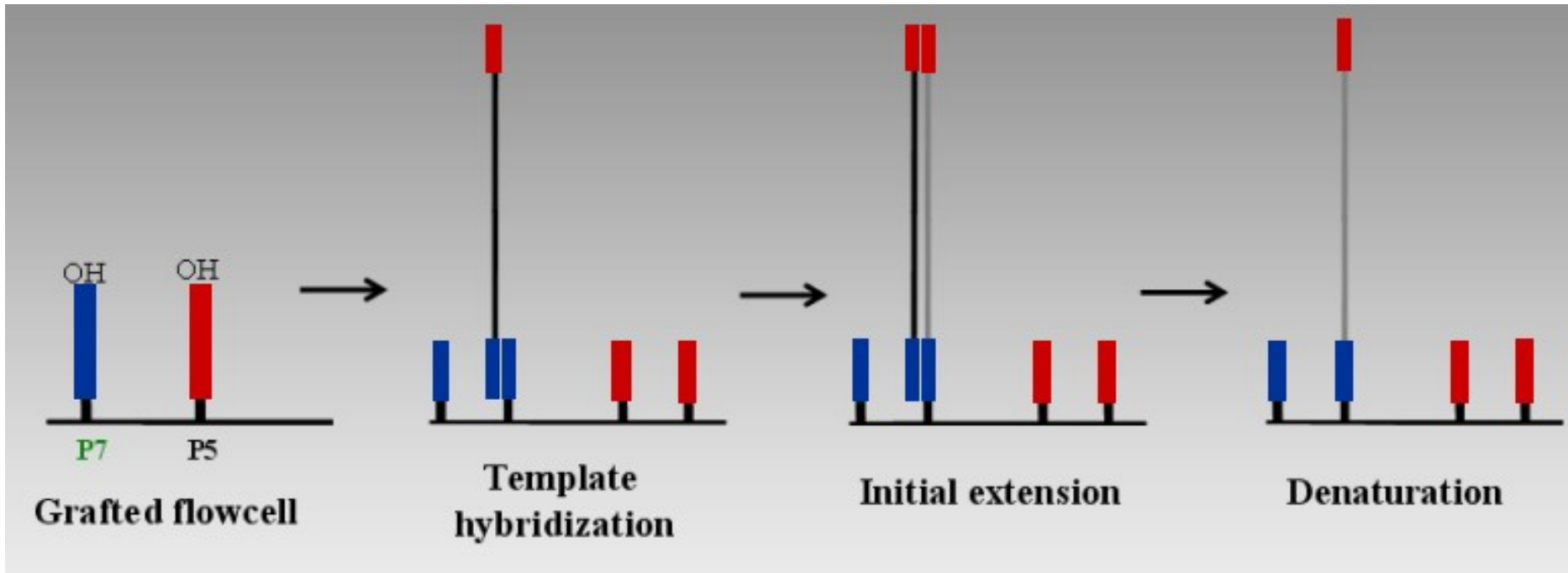
- Uvedena na trh 2006
- Prošla řadou inovací, zejména délky čtení
- Masivní paralelní sekvenování milionů fragmentů DNA („polony“ sequencing)
- Sekvenacování syntézou na čipu (flow cell), které využívá strategii reverzibilních terminátorů
- Nevyžaduje klonování ani přípravu knihovny na mikrosférách
- Dosahuje 99,9 % přesnosti

Příprava knihovny – polony PCR

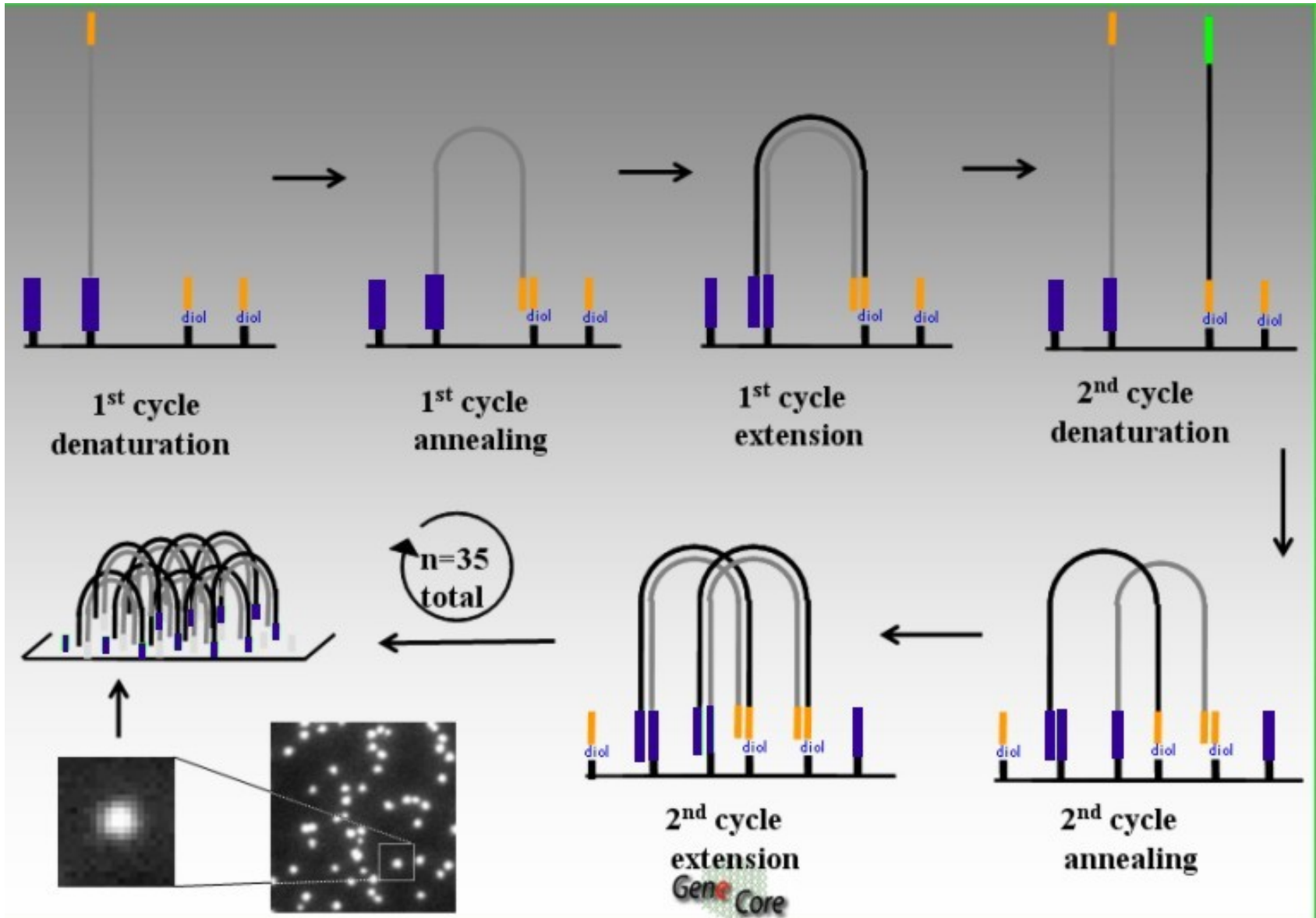
- Náhodná fragmentace DNA na krátké úseky 200 – 500 bp
- Zatupení konců a vytvoření 1 nt A-přesahu na 3'-konci (T4 DNA polymeráza, Klenow a polynukleotid-kináza T4)
- Navázání adaptorů umožňujících kovalentní vazbu na opticky transparentní povrch pro sekvenování
- Každý fragment je na povrchu uchycen pouze jedním koncem, po přidání enzymů pro amplifikaci dochází k ohnutí fragmentu do „mostu“.
- Výsledkem amplifikace jsou dva řetězce, každý s jedním volným a jedním pevným koncem
- Po denaturaci jsou fragmenty narovnány a uspořádány do shluků, ve kterých je dosažena značná hustota, až 1000 kopií fragmentu na μm^2 povrchu
- Na celém povrchu je dosaženo hustoty deseti milionů shluků na cm^2



Bridge amplification:
initiation

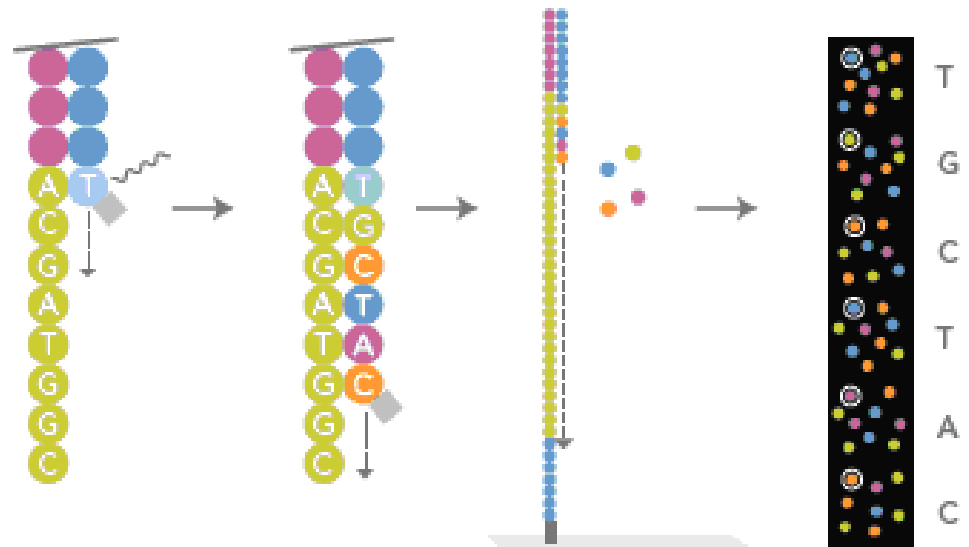


On the surface: complementary oligos



Illumina

- **Průběh sekvenační reakce**
- Přidání primerů ve směsi s DNA polymerázou a fluorescenčně značenými dNTP
- Nukleotidy jsou na 3'-konci modifikovány tak, že umožňují **reverzibilní ukončení** prodlužujícího se řetězce DNA
- Je tak zajištěno, že se řetězec v každém cyklu prodlouží právě o jednu bázi.
- Po zachycení obrazu připojené báze následuje odblokování 3'-konce



Illumina

- Délka čtených úseků:
 - HiSeq : 100 nt or 150 nt
 - MiSeq : 250 nt
- Mnohonásobné pokrytí sekvence (30 x – 100 x)
- Možnost mnohonásobného sekvenování
 - Povrch sklíčka rozdělen do částí
 - Vzorky označeny pomocí **dvanácti** různých oligonukleotidů
 - Současně lze analyzovat až 96 různých vzorků.
- Produkuje desítky až stovky Gb za 1 běh (2 - 8 dnů)
- Aplikace
 - Resekvenování
 - Sekvenování RNA
 - Stanovení metylací

MiSeq



Sekvenování třetí generace

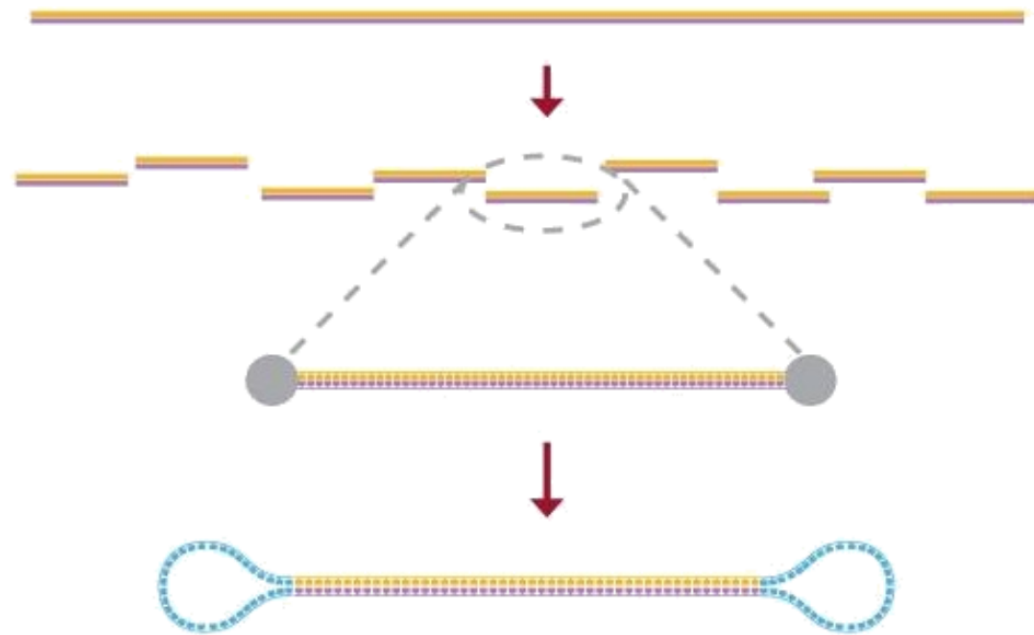
- Analýza jedné molekuly
- Potřeba malého množství vzorku
- Bez rizika kontaminace
- Přesné čtení homopolymerních úseků
- Analýza jakékoli NK (DNA/RNA)
- Analýza poškozených NK (archaické, muzejní, forenzní)
- Analýza DNA z nekultivovatelných organismů
- Absolutní kvantifikace

PacBio

- **Kružnicové kontinuální sekvenování**
- SMRT templát obsahuje **dvouřetězcovou oblast** (inzert) na obou koncích **uzavřenou jednořetězcovými vlásenkovými smyčkami**
- Vlášenkové smyčky představují jednořetězcovou oblast, na kterou se může vázat sekvenační primer.
- Polymeráza prodlužuje primer z jedné vlásenkové struktury využívá jedno vlákno DNA jako templát a druhé vytěsňuje
- Když se polymeráza dostane zpět k 5'konci primeru, začne vytlačovat již nasyntetizovaný řetězec a pokračuje v syntéze DNA
- Výsledná sekvence je odvozená z obou vláken

Příprava knihovny pro PacBio

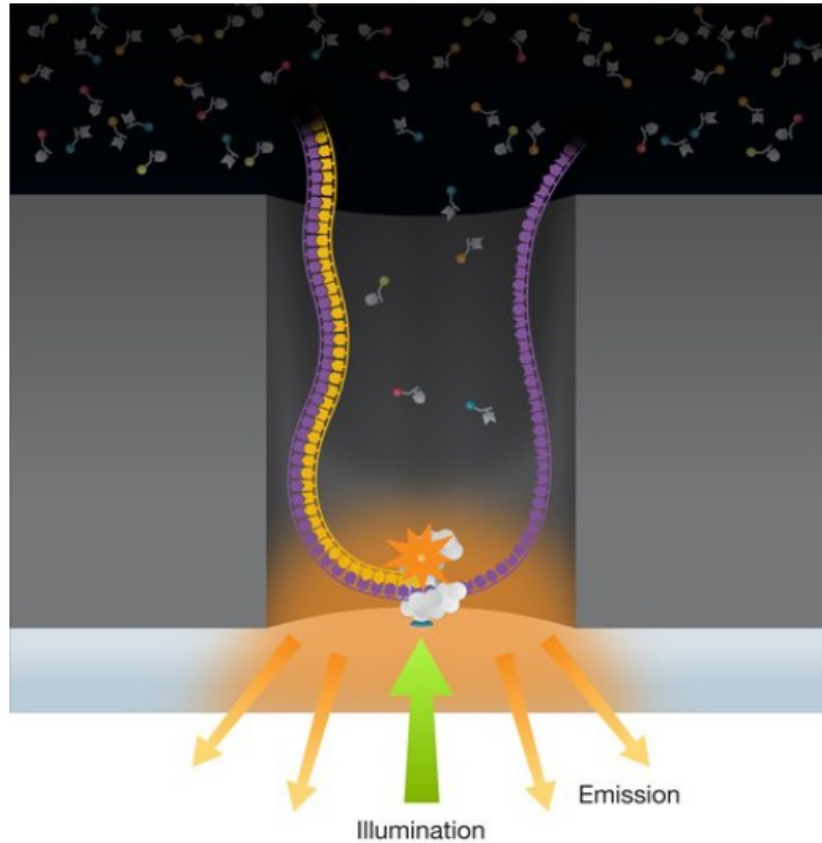
Template Preparation



SMRTbell™ Template preparation can be used to create libraries of various insert sizes from 250 bp to 20,000 bp depending on the needs of the application.

Sekvenování třetí generace – PacBio RS

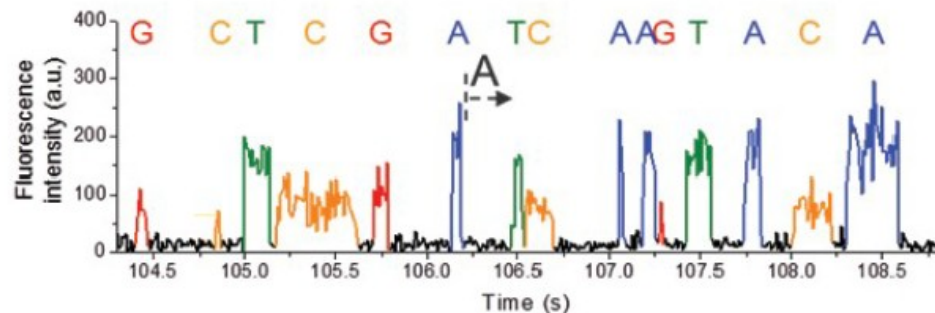
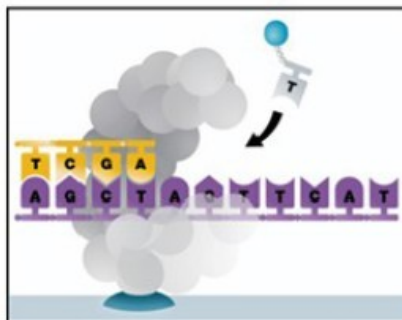
Pacific Biosciences



4 nucleotides with different fluorescent dye simultaneous present

2-3 nucleotides/sec
2-3 Kb (up to 50) read length
6 TB data in 30 minutes

laser damages polymerase



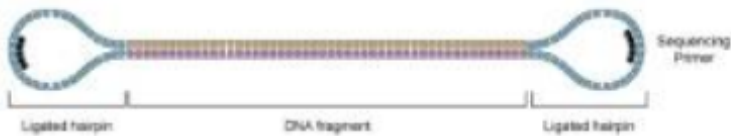
PacBio

High-throughput sequencing



Library preparation

SMRTBell 'template'



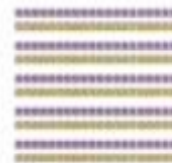
Standard 'Sequencing'



Single pass

&

Circular 'Consensus' Sequencing'



Continued generations of reads

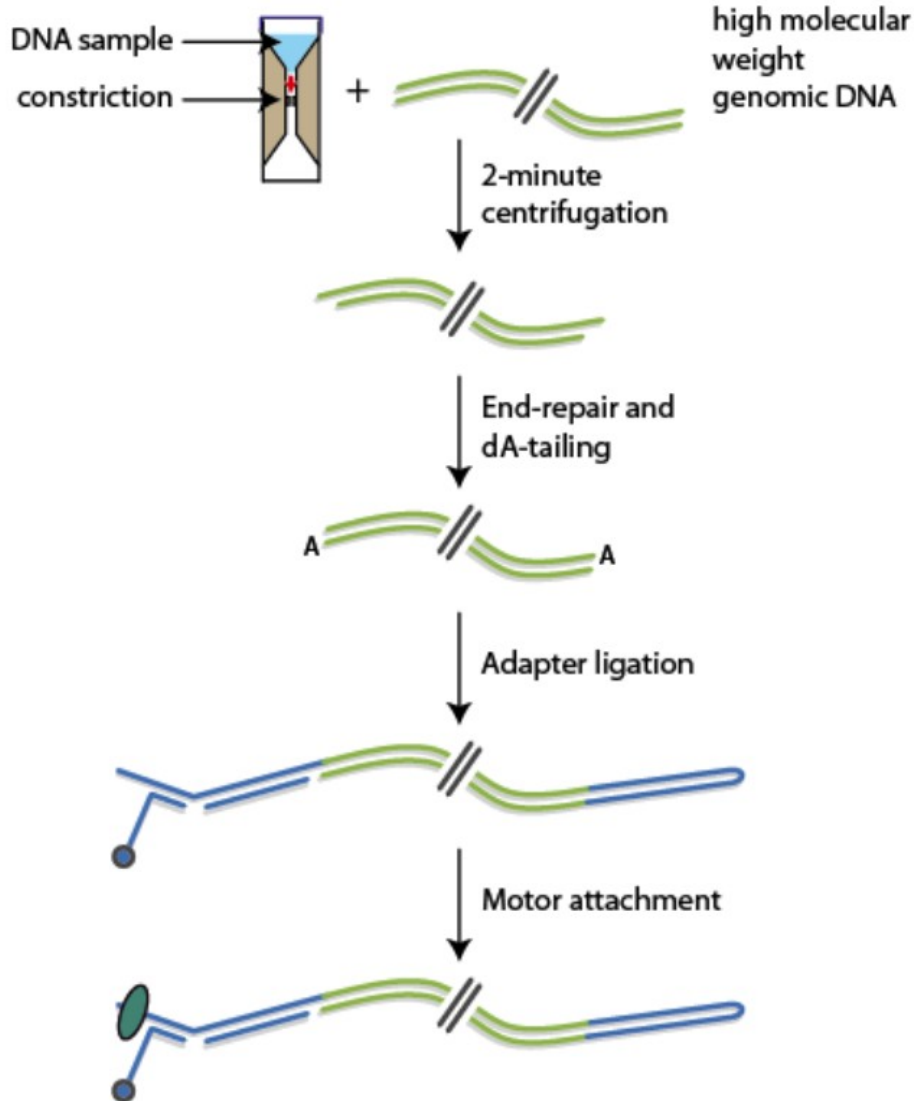
Multiple passes

&

NanoPore (1995)

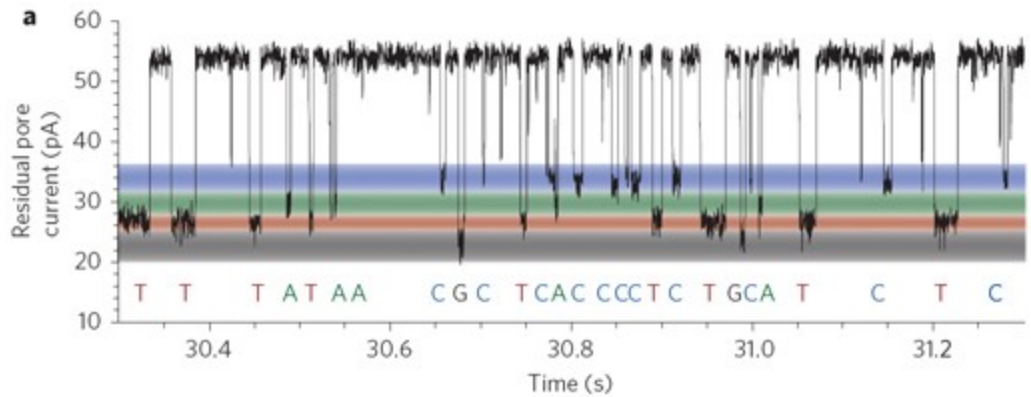
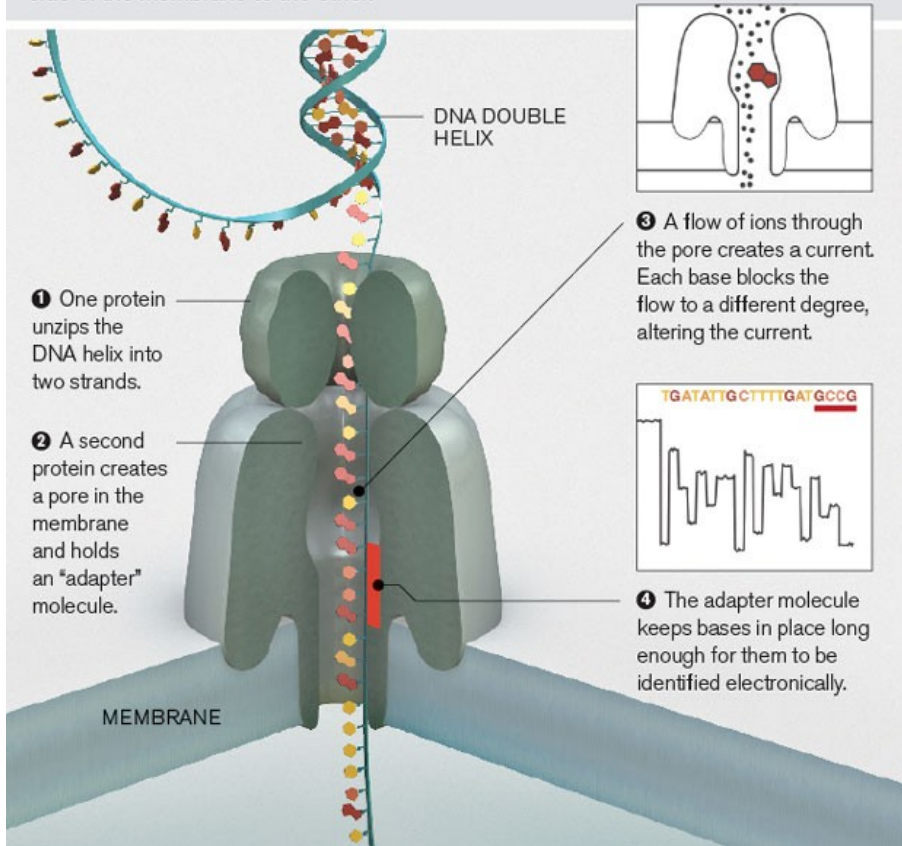
- **Využívá měření elektrického potenciálu přes membránu**
- Elektricky odolná polymerní membrána (synтетická lipidová dvouvrstva) s transmembránovým porózním proteinem
- Modifikovaný α hemolysin (α HL) nebo porin A (MspA) *Mycobacterium smegmatis*
- Nanopore je ponořený ve vodivém roztoku
- Průchod bází na sekvenovaném řetězci přerušuje proud, který je **specifický podle procházející báze**

G-tube sense/antisense



Příprava knihovny MinION

DNA can be sequenced by threading it through a microscopic pore in a membrane. Bases are identified by the way they affect ions flowing through the pore from one side of the membrane to the other.



the MinION device



the MinION device