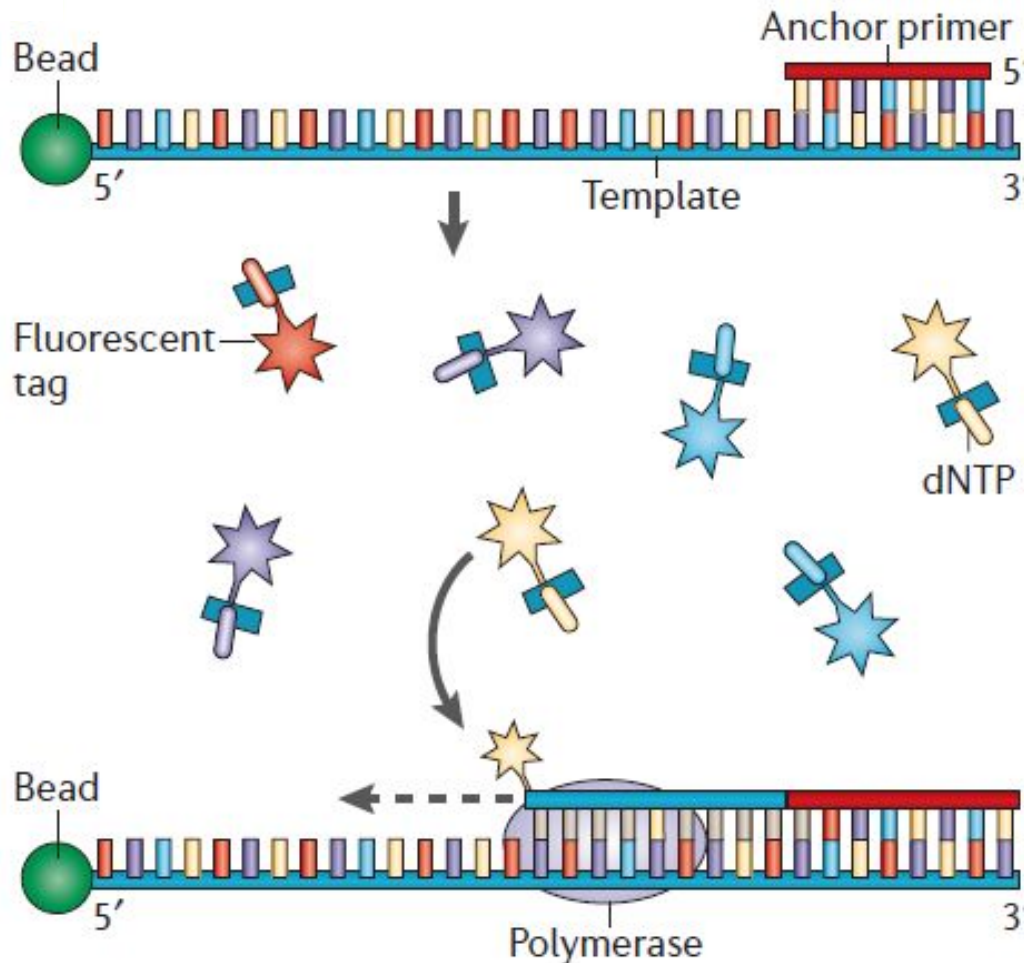


Стратегии секвенирования кластеров ДНК в секвенаторах второго поколения

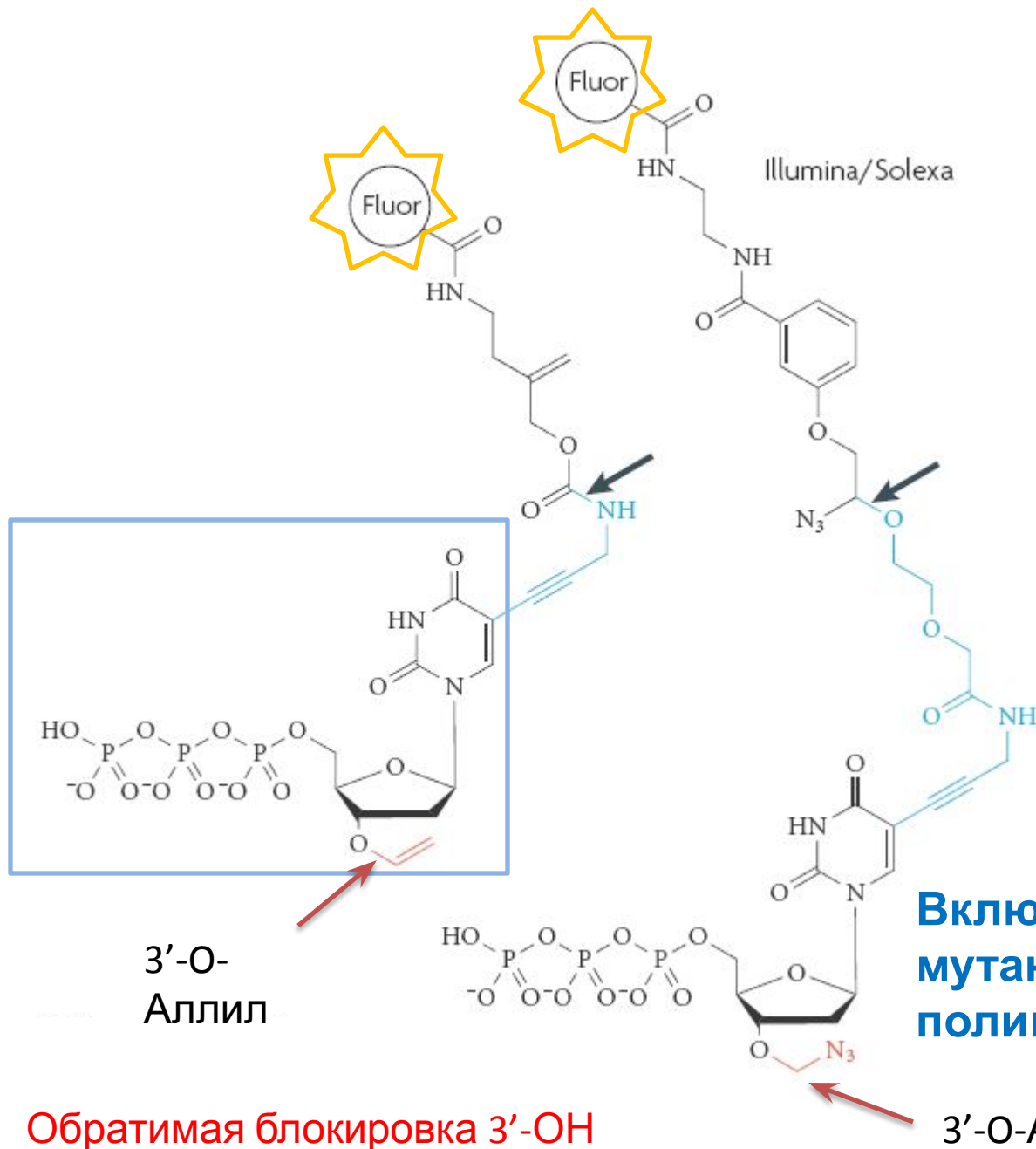
2.

Секвенирование синтезом (sequencing by synthesis – SBS)



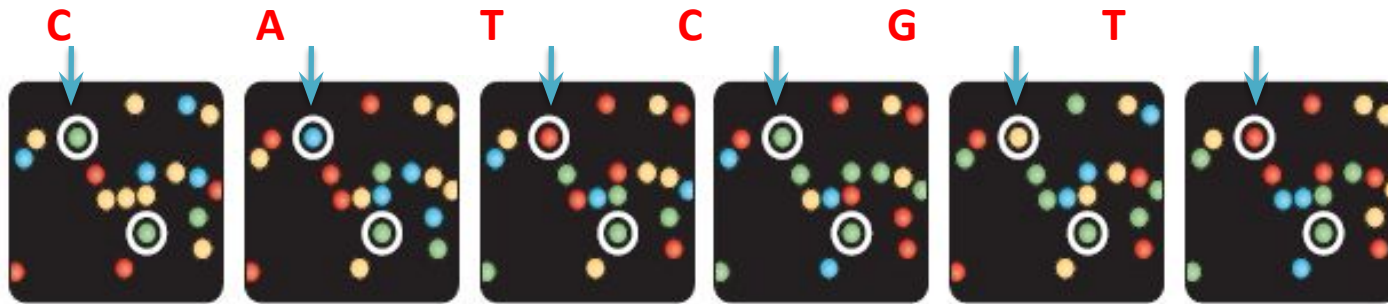
- Включение флуоресцентного терминатора
- Считывание
- Деблокирование и удаление флуорофора

Структура некоторых обратимых терминаторов синтеза ДНК



Обратимая блокировка 3'-ОН группы

Извлечение информации из неупорядоченных микроматриц при секвенировании ДНК



Каждый dNTP мечен своим флуорофором

Циклы: 1

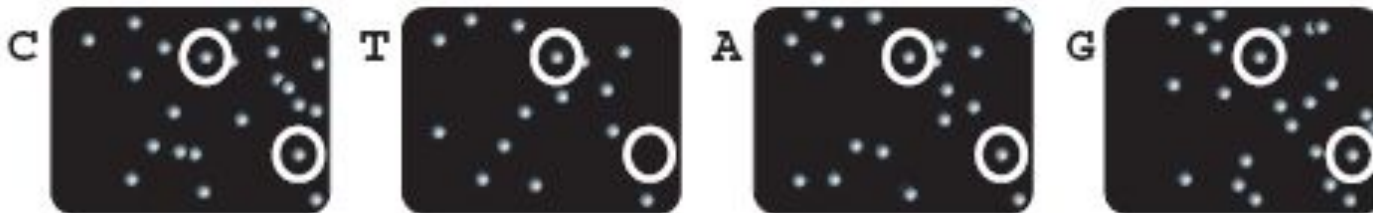
2

3

4

5

6



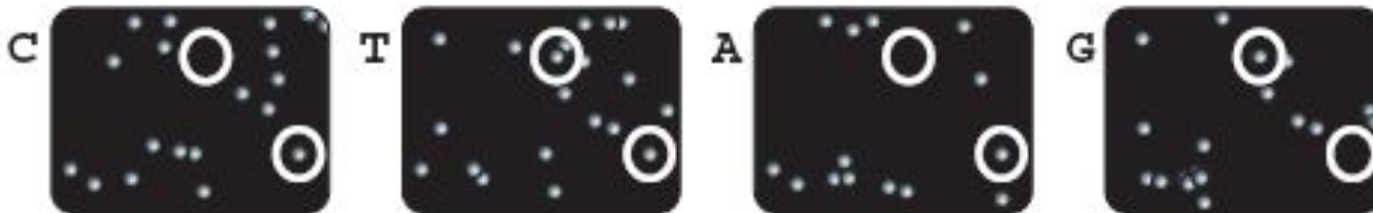
Все dNTPs мечены одним флуорофором

Циклы: 1

2

3

4



В каждом цикле добавляют только один dNTP

Циклы: 5

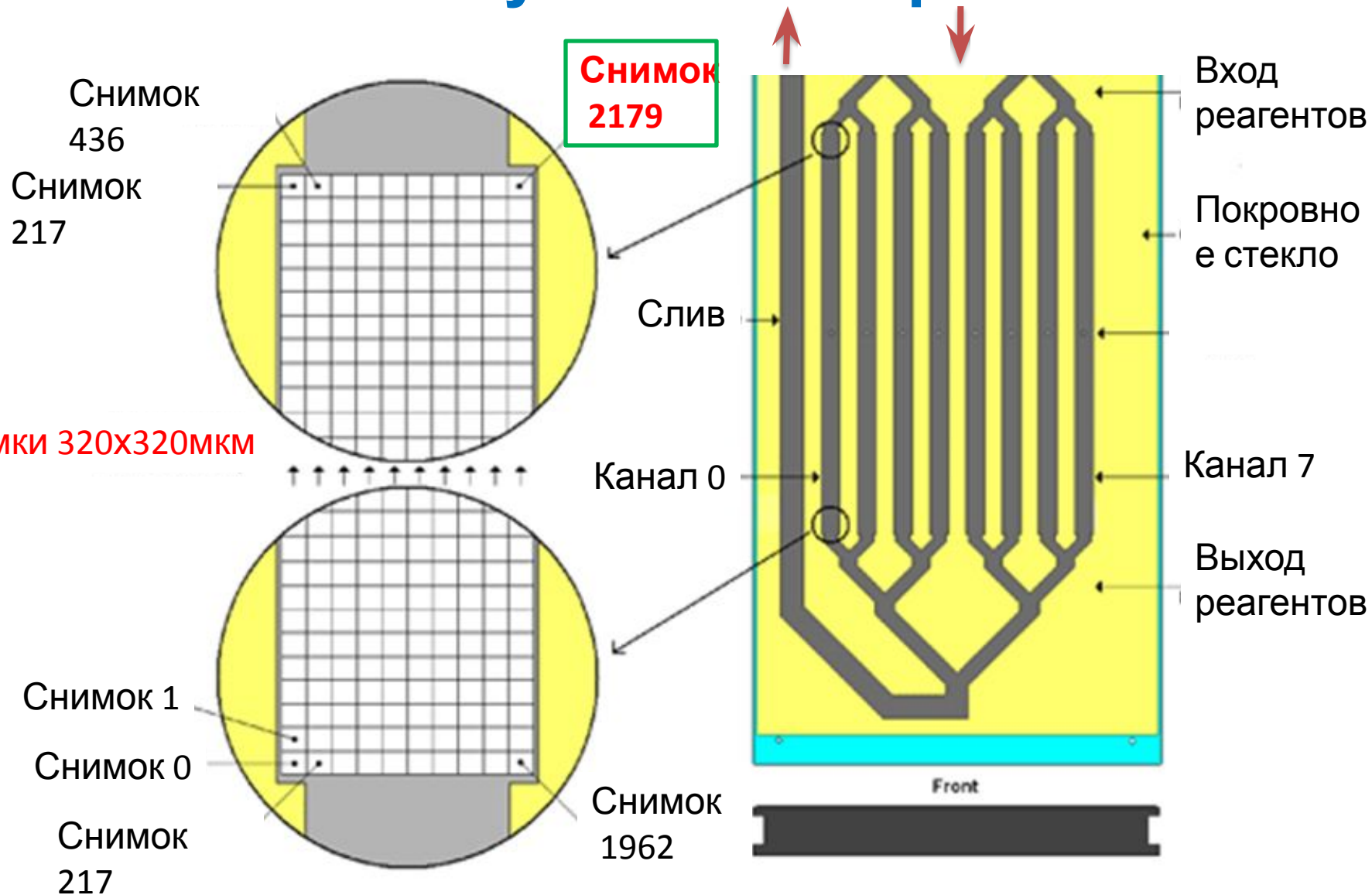
6

7

8

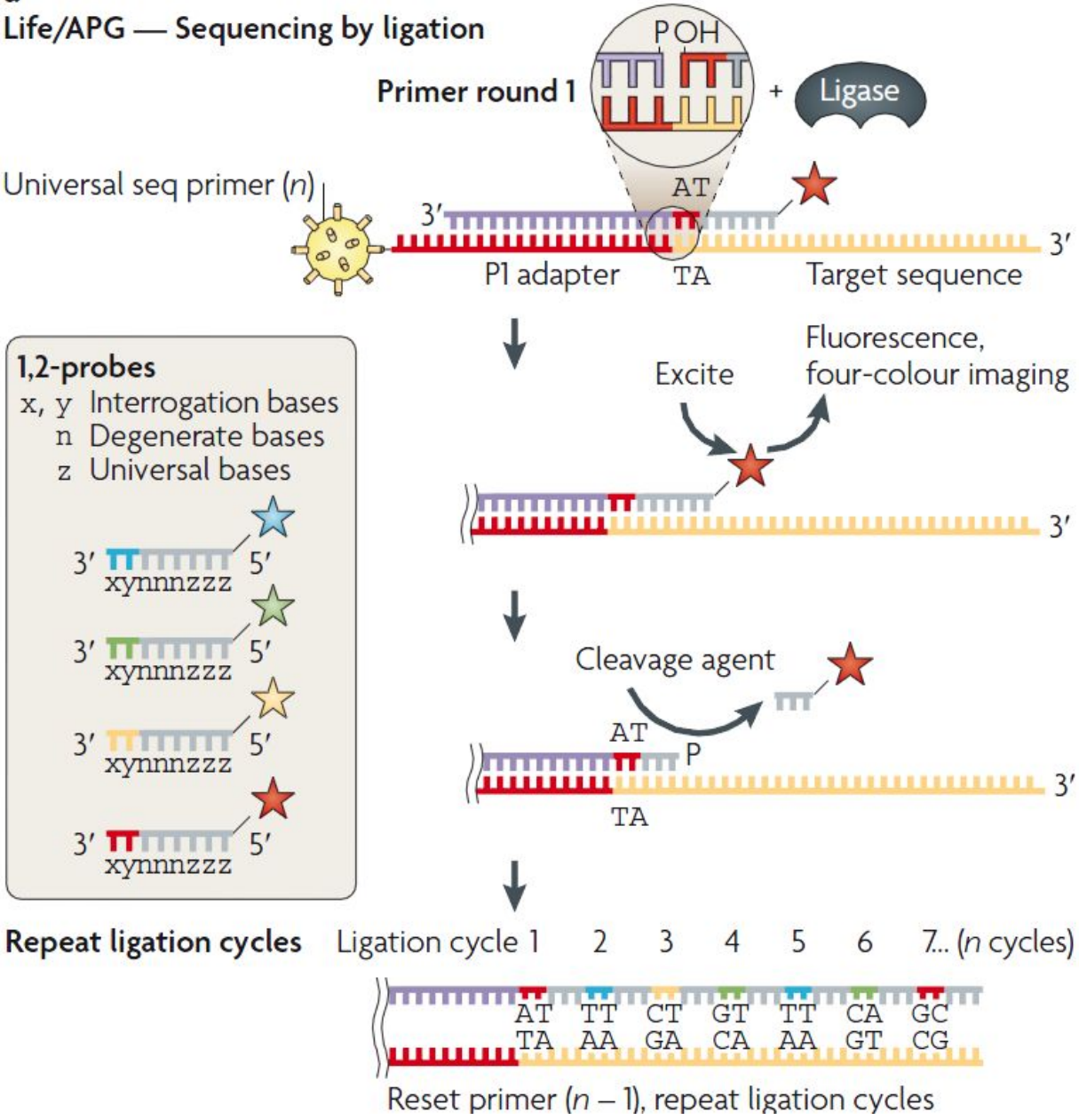
Последовательности, верхний ряд: **СТАГТГ**, нижний ряд: **САГСТА**

Проточная ячейка Полонатора и схема получения изображений

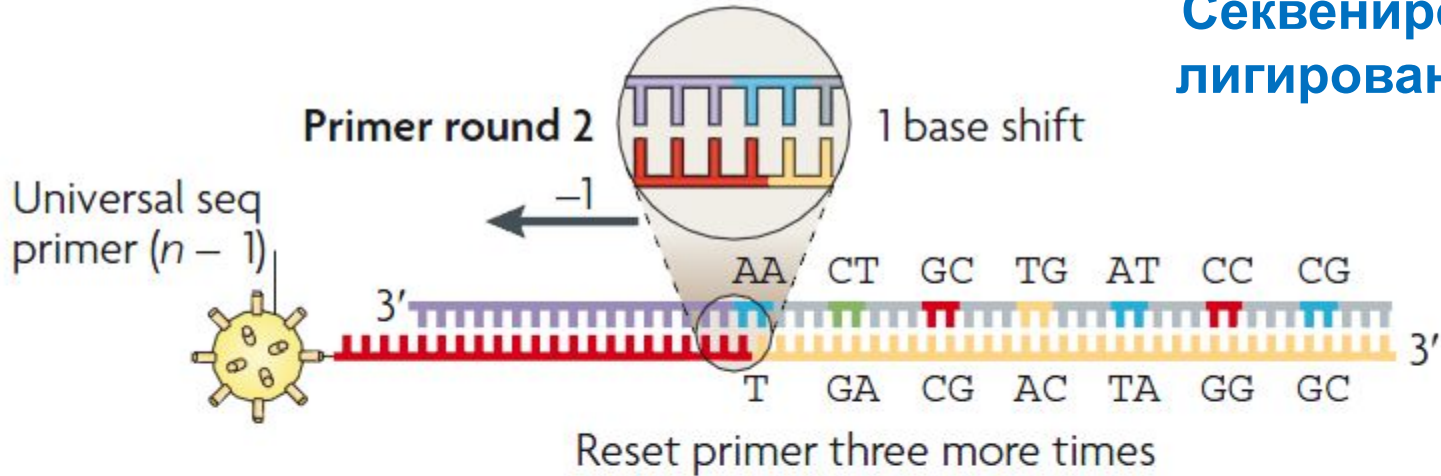


Секвенирование игрированием (1)

a
Life/APG — Sequencing by ligation



Секвенирование лигированием (2)

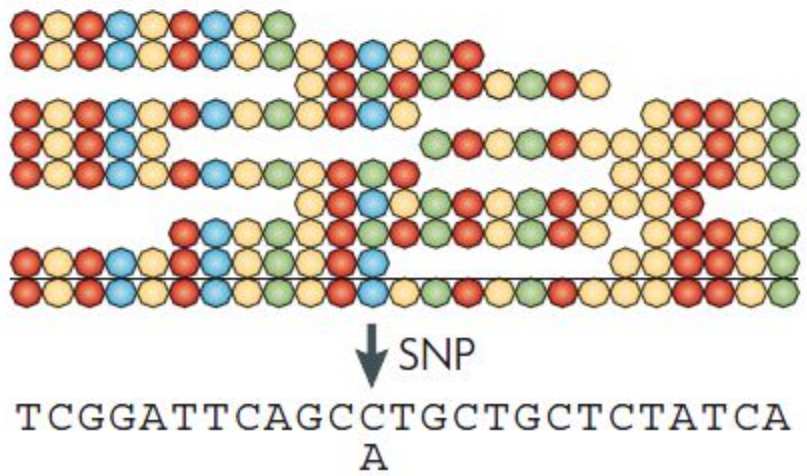


b

Two-base encoding: each target nucleotide is interrogated twice

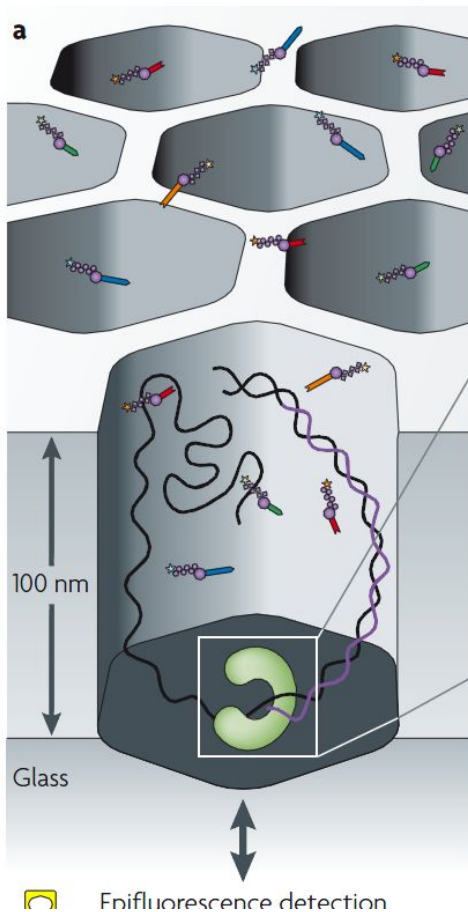
2nd base		Template sequence
1st base	A C G T	
A	● ● ● ●	ATACAAGA
C	● ● ● ●	CGCACCTC
G	● ● ● ●	GCGTGGAG
T	● ● ● ●	TATGTTCT

Alignment of colour-space reads to colour-space reference genome

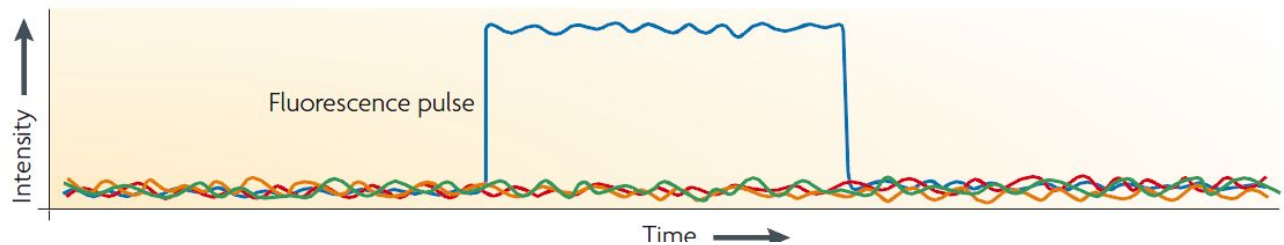
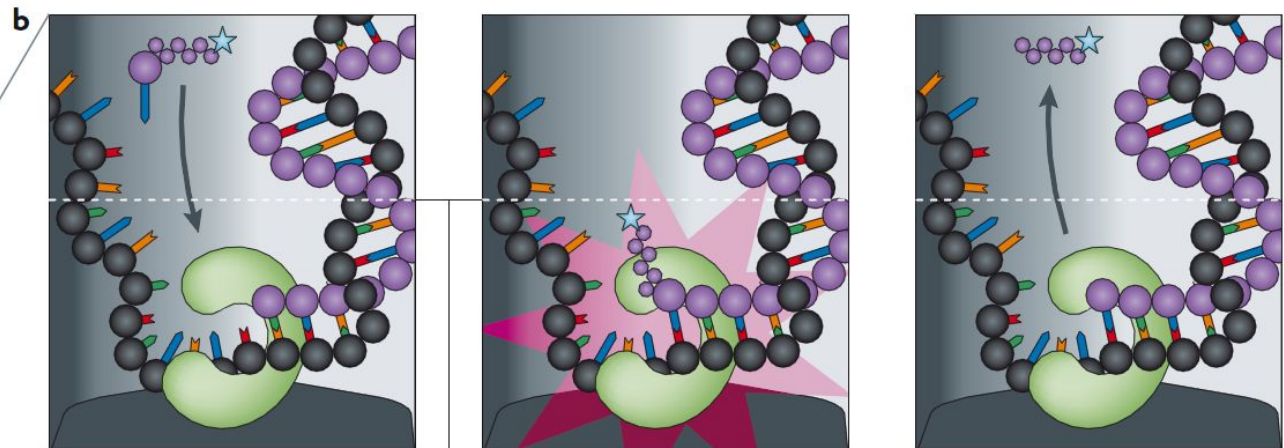


Секвенатор третьего поколения фирмы Pacific Biosciences

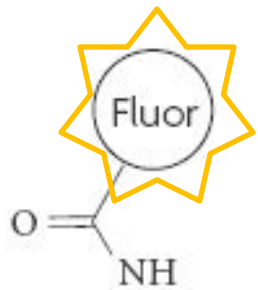
Pacific Biosciences — Real-time sequencing



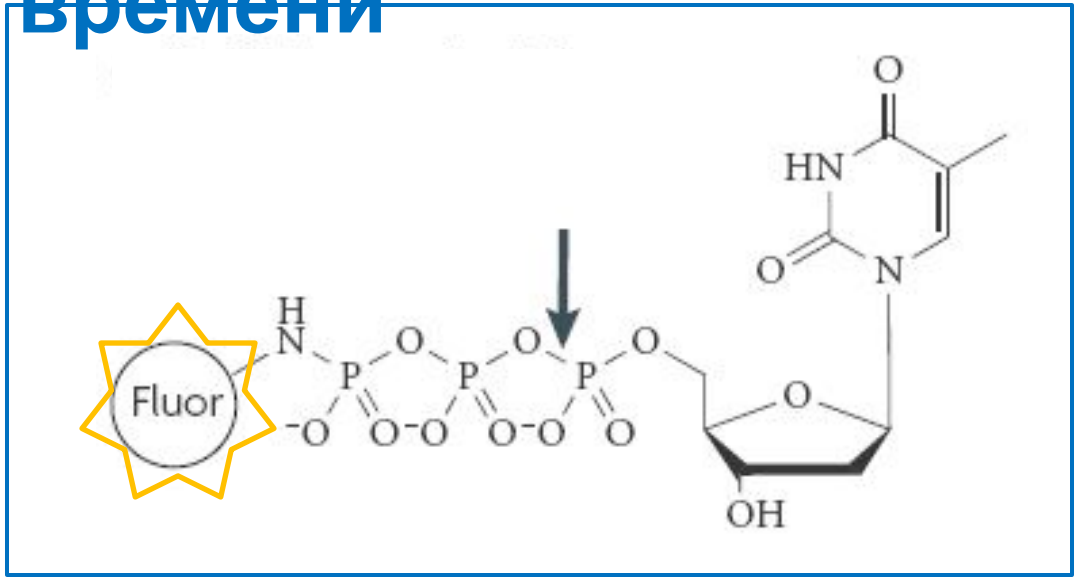
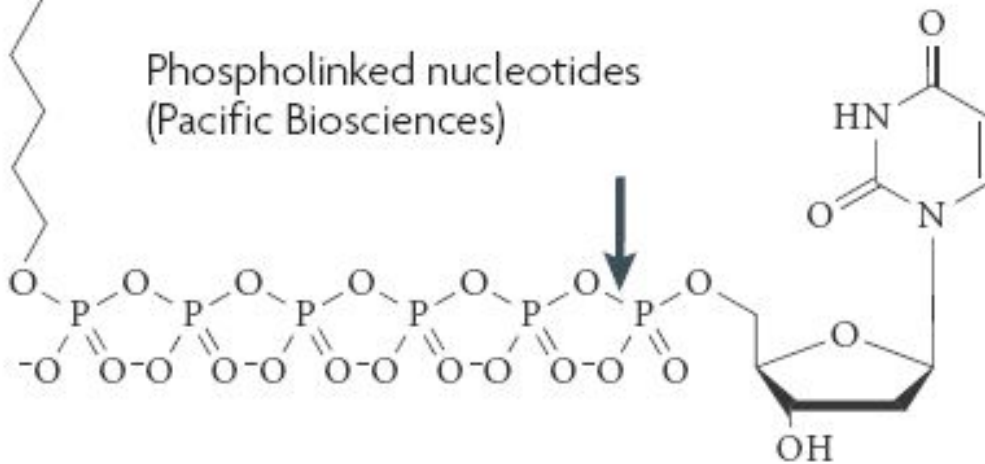
Phospholinked hexaphosphate nucleotides



Производные нуклеотидов для измерения флуоресценции в реальном времени

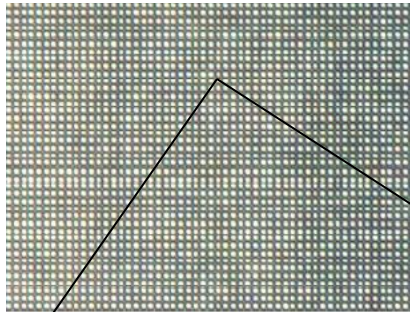


Phospholinked nucleotides
(Pacific Biosciences)

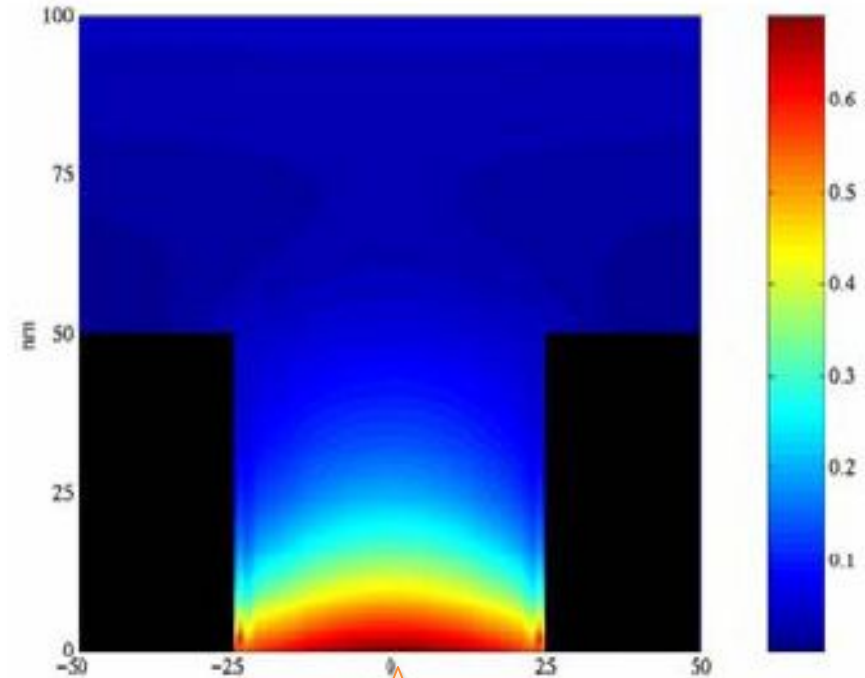


Включение нуклеотида в ДНК сопровождается освобождением флуорофора

Строение и принцип действия SMRT-чипа (Single Molecule Real Time Sequencing-chip)



SMRT-чип
43,5 x 32,8 мкм

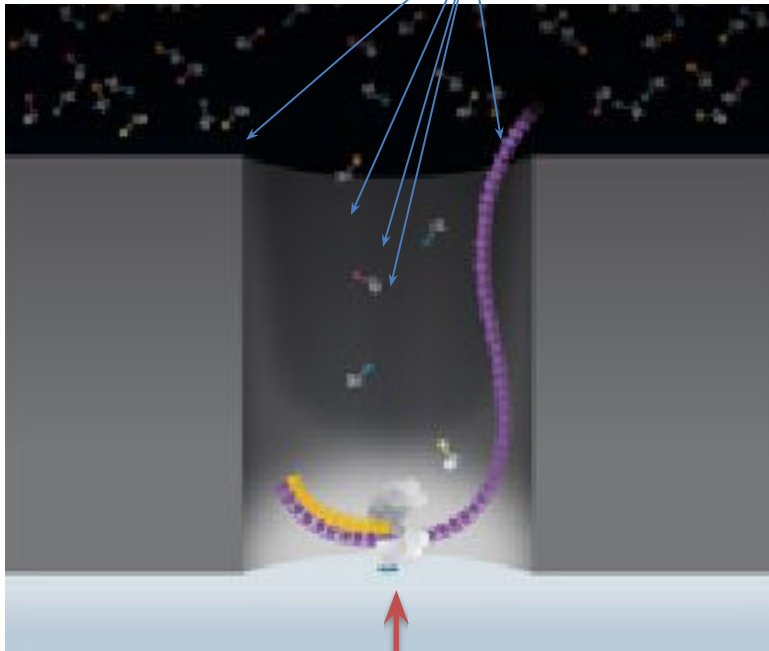


Источник
света

Диаметр отверстия каждого волновода (50 нм) в SMRT-чипе значительно меньше длины волны видимого света, поэтому свет проникает вглубь лишь на небольшое расстояние

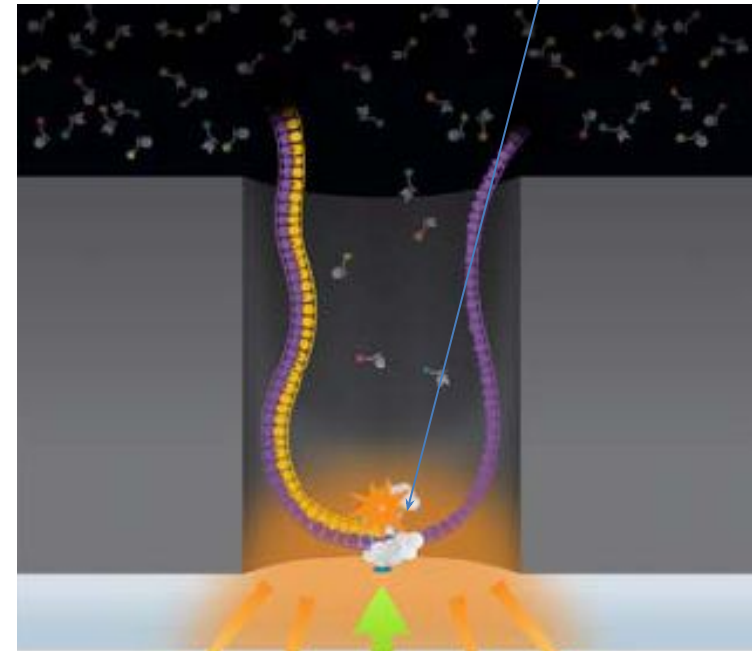
Схема синтеза ДНК в ZMW-волноводе

Меченые dNTPs



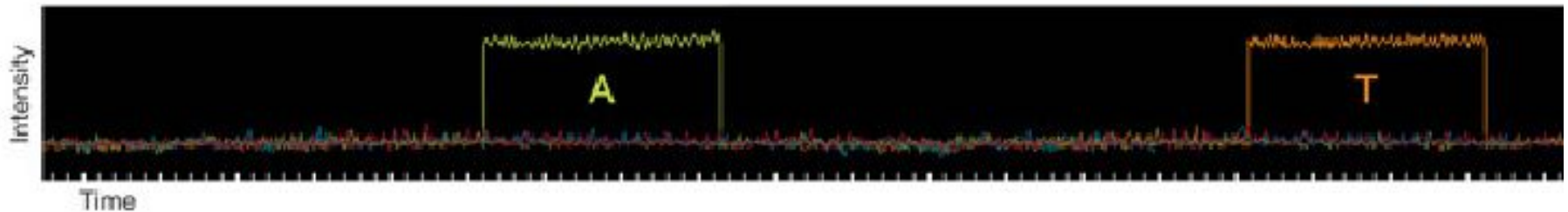
Одна молекула ДНК-полимеразы иммобилизована на дне каждого волновода

Включившийся dNTP



Эмиссия
Возбуждения

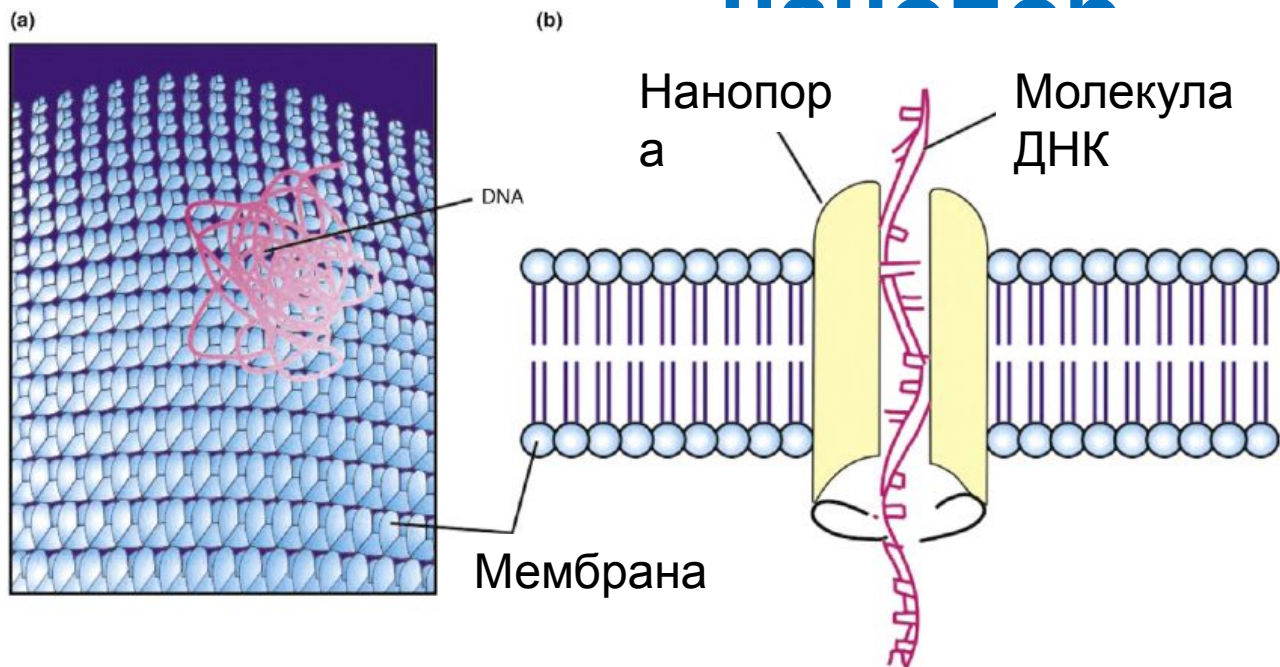
Процесс секвенирования ДНК на SMRT-чипе



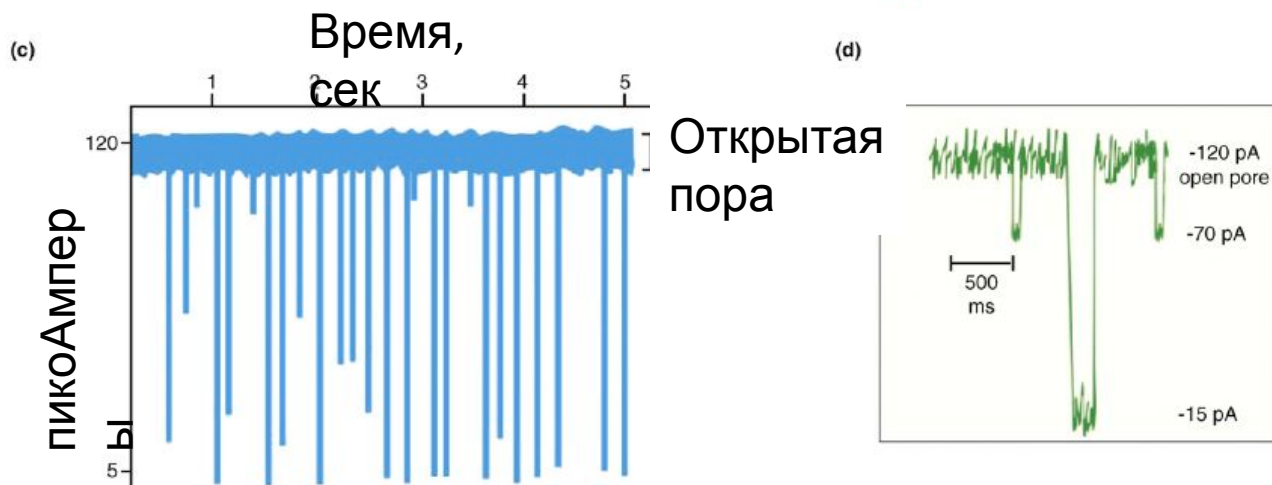
Включающийся в ДНК меченый нуклеотид задерживается в объеме считывания флуоресценции в течение миллисекунд, свободно диффундирующий нуклеотид – в течение наносекунд.

Включение обнаруживается в виде вспышки света определенной длины волны, характерной для конкретного нуклеотида..

Секвенирование ДНК с помощью



Часть мембраны с нанопорой, через которую проходит одноцепочечная ДНК



Изменения силы тока, проходящего через мембрану, под действием отдельных нуклеотидов ДНК

Уникальная последовательность
Гомополимер

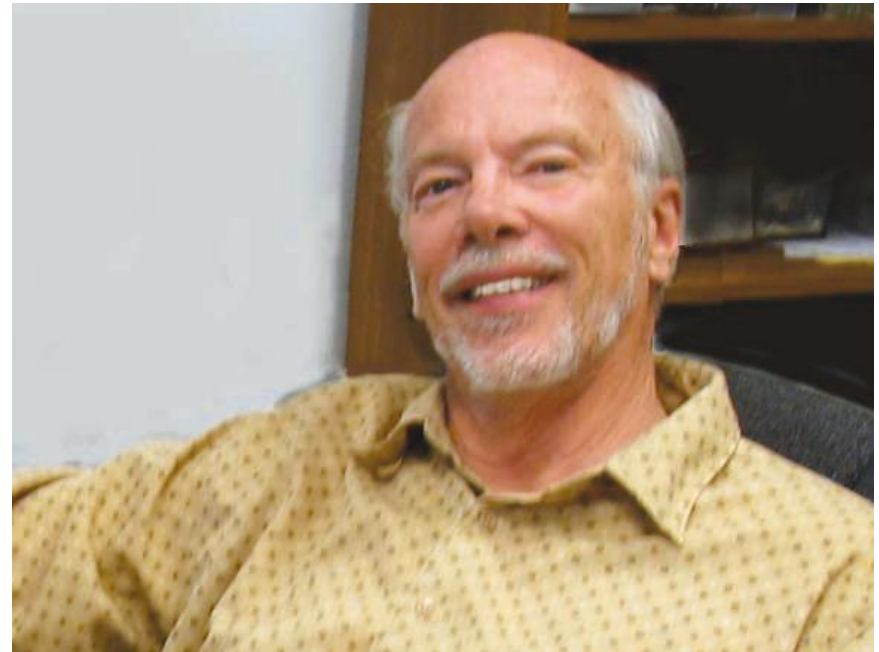
Профиль изменений силы электрического тока во времени при секвенировании ДНК с использованием нанопор



Секвенатор третьего поколения фирмы Oxford Nanopore Technologies (2012 г)



Производительность 1 млрд
нуклеотидов за 6 часов
Десятки тысяч нуклеотидов/1
прогон
Компьютер – ноутбук с USB-
разъемом



Дэвид Димер (David Deamer) -
Предложил принцип метода
секвенирования через нанопоры в
1989 году

Paired-End Reads

Поиск структурных геномных вариантов секвенированием по объединенным концевым последовательностям

