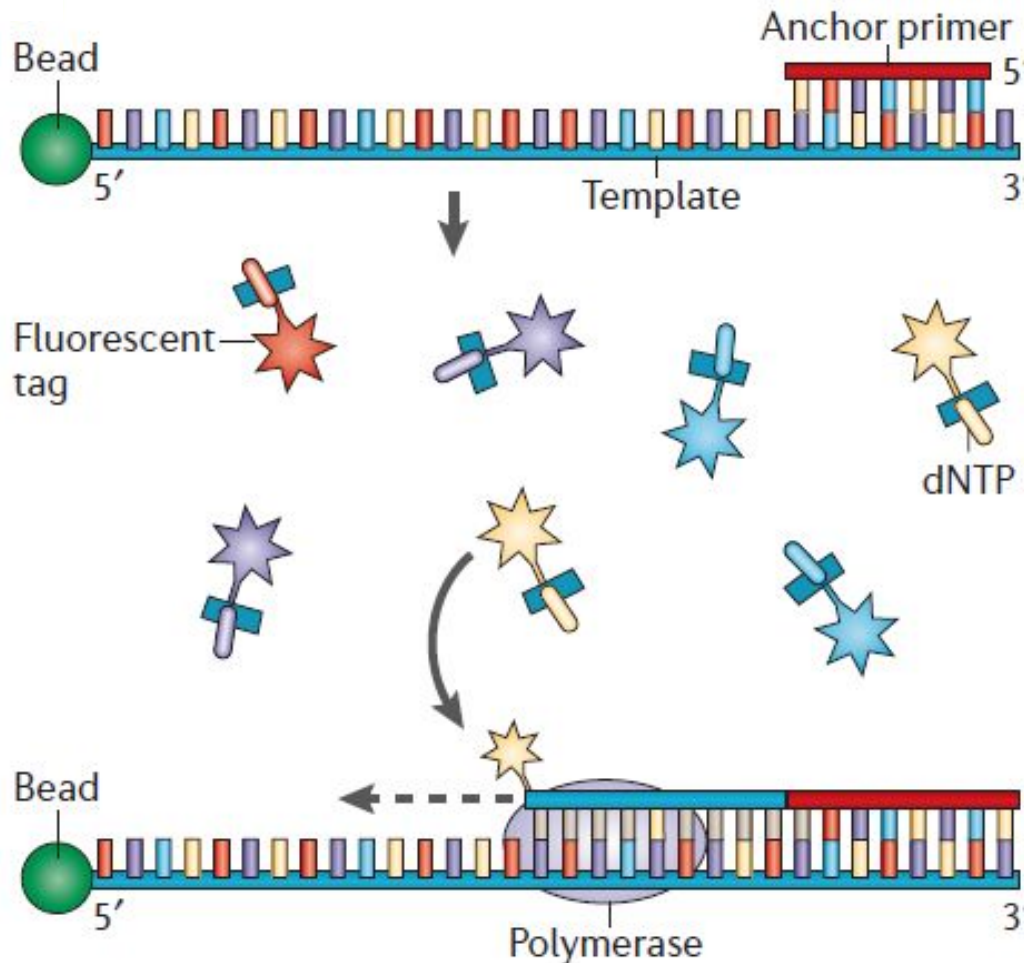


# Стратегии секвенирования кластеров ДНК в секвенаторах второго поколения

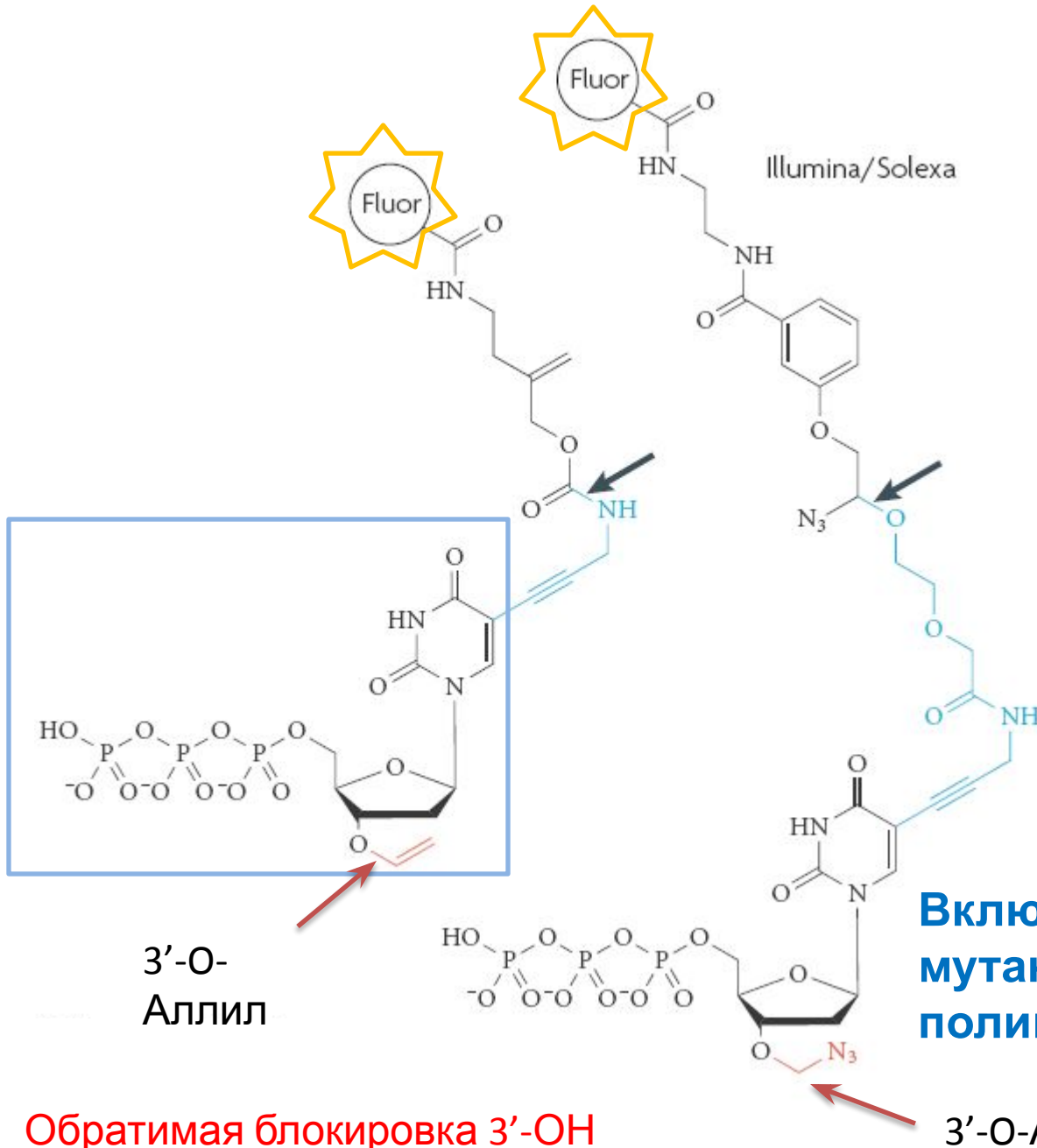
2.

## Секвенирование синтезом (sequencing by synthesis – SBS)

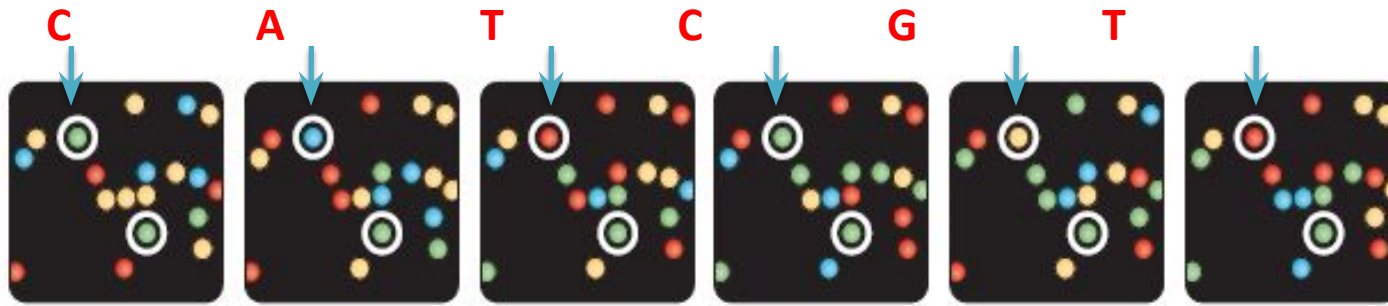


- Включение флуоресцентного терминатора
- Считывание
- Деблокирование и удаление флуорофора

# Структура некоторых обратимых терминаторов синтеза ДНК



# Извлечение информации из неупорядоченных микроматриц при секвенировании ДНК



Каждый dNTP  
мечен своим  
флуорофором

Циклы: 1

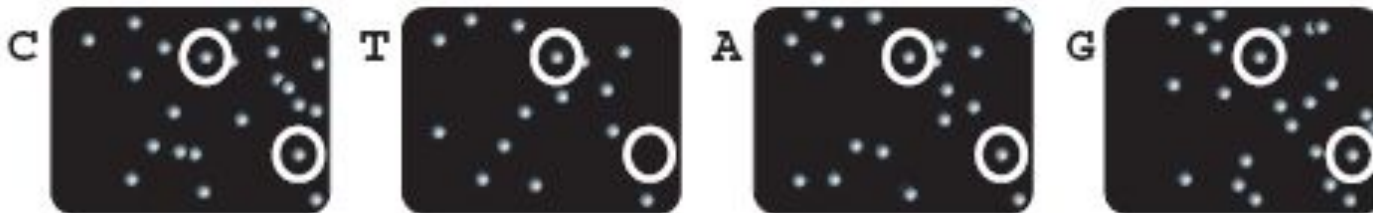
2

3

4

5

6



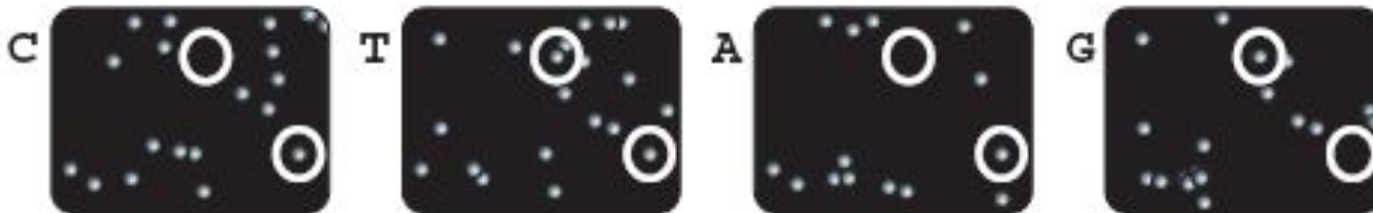
Все dNTPs  
мечены  
одним  
флуорофором

Циклы: 1

2

3

4



В каждом  
цикле  
добавляют  
только один  
dNTP

Циклы: 5

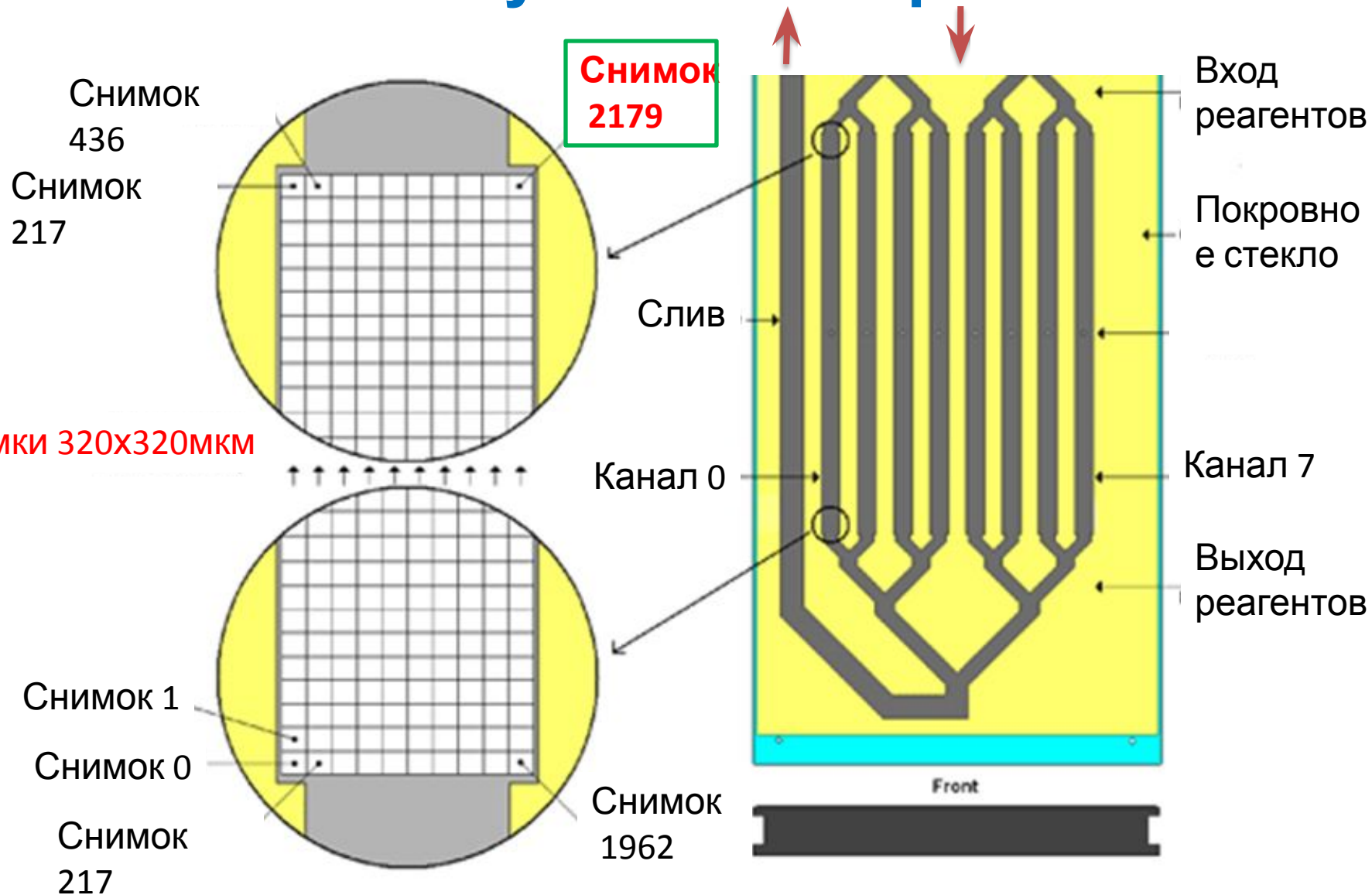
6

7

8

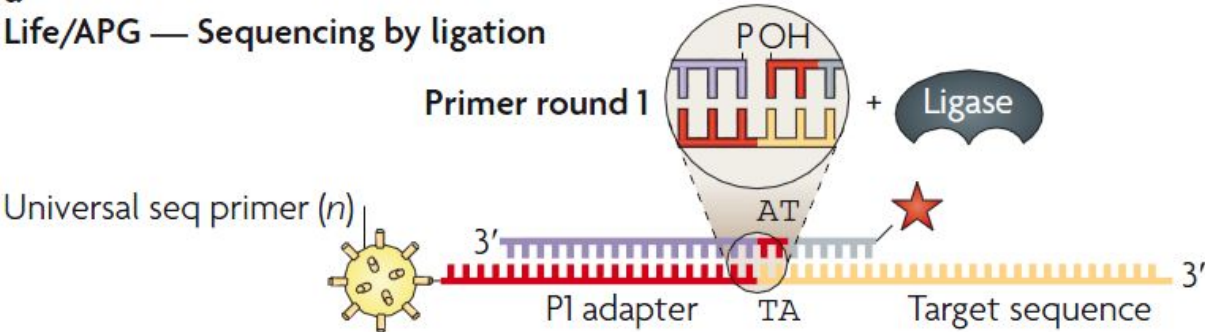
Последовательности, верхний ряд: **СТАГТГ**, нижний ряд:  
**САГСТА**

# Проточная ячейка Полонатора и схема получения изображений

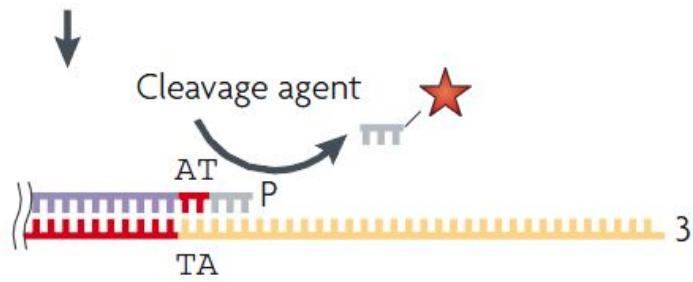
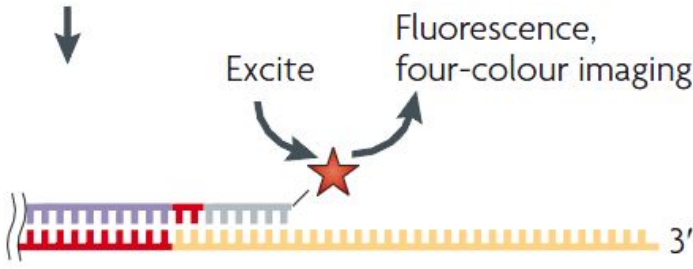


# Секвенирование игрированием (1)

**a**  
Life/APG — Sequencing by ligation



**1,2-probes**  
 x, y Interrogation bases  
 n Degenerate bases  
 z Universal bases



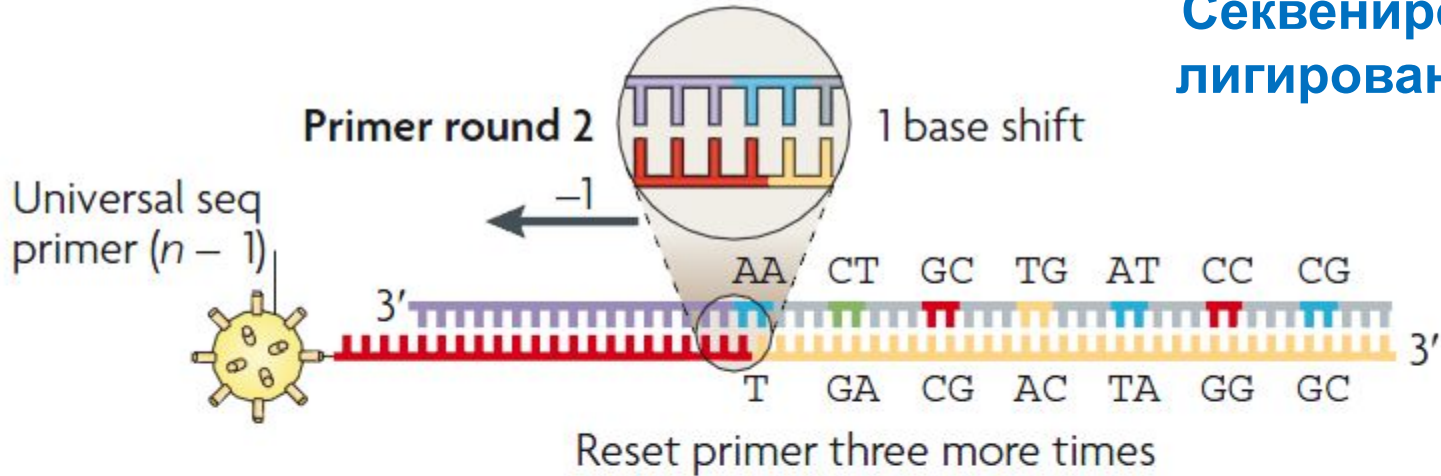
Repeat ligation cycles Ligation cycle 1 2 3 4 5 6 7.. ( $n$  cycles)



Reset primer ( $n - 1$ ), repeat ligation cycles



# Секвенирование лигированием (2)

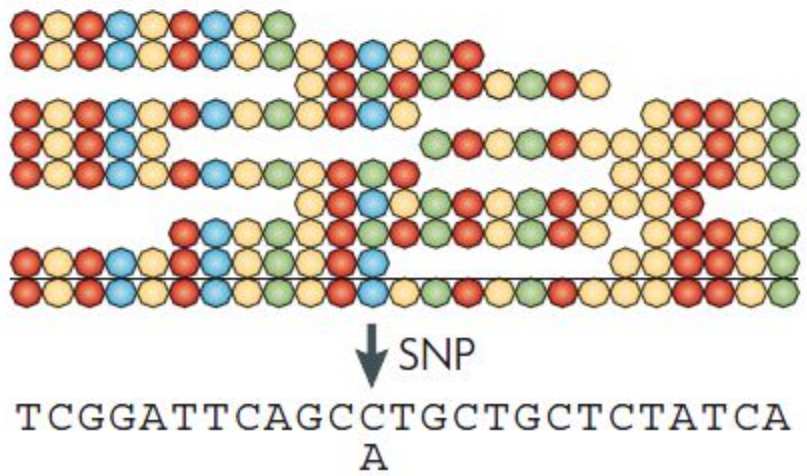


**b**

Two-base encoding: each target nucleotide is interrogated twice

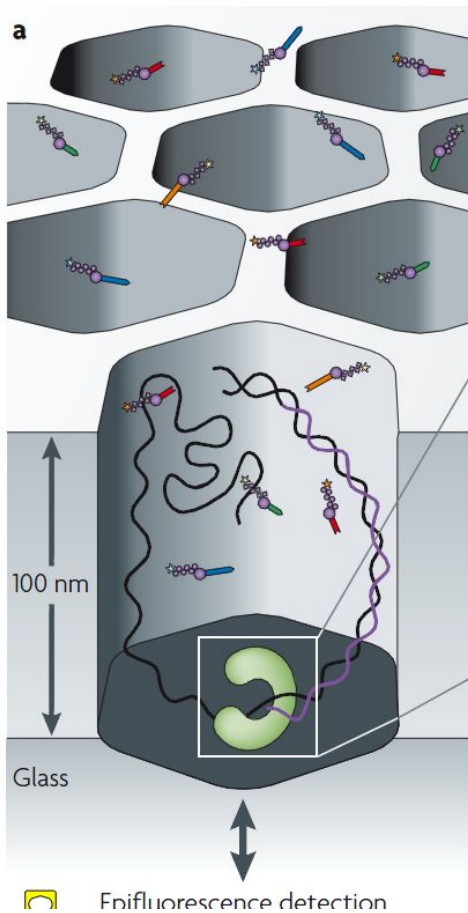
		2nd base				Template sequence
		A	C	G	T	
1st base	A					ATACAAGA
	C					CGCACCTC
	G					GCGTGGAG
	T					TATGTTCT

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

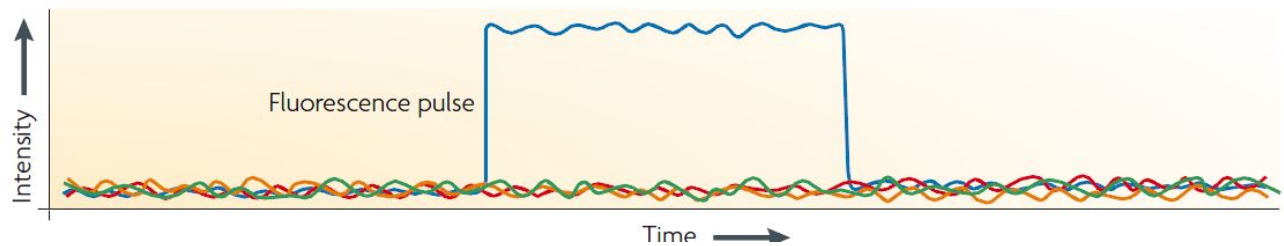
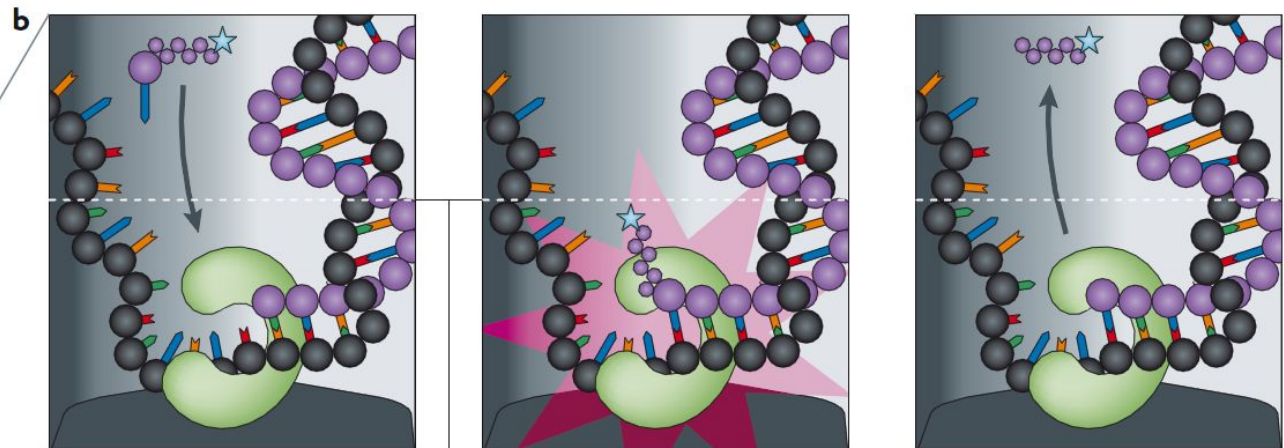


# Секвенатор третьего поколения фирмы Pacific Biosciences

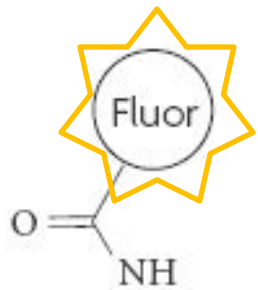
Pacific Biosciences — Real-time sequencing



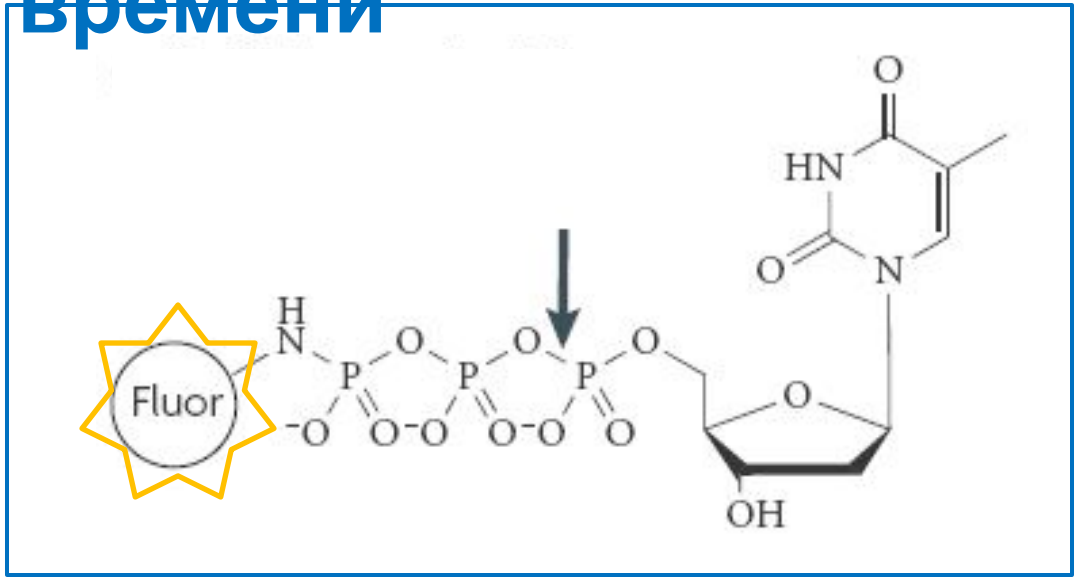
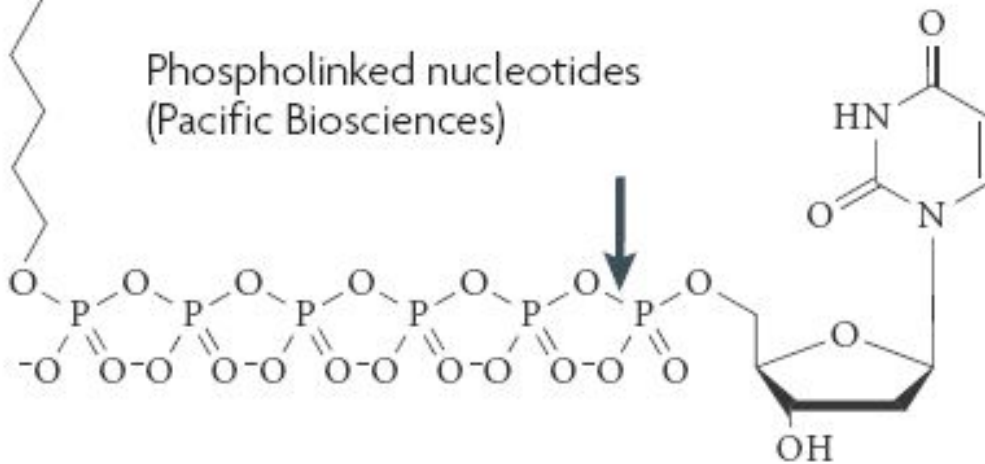
Phospholinked hexaphosphate nucleotides



# Производные нуклеотидов для измерения флуоресценции в реальном времени

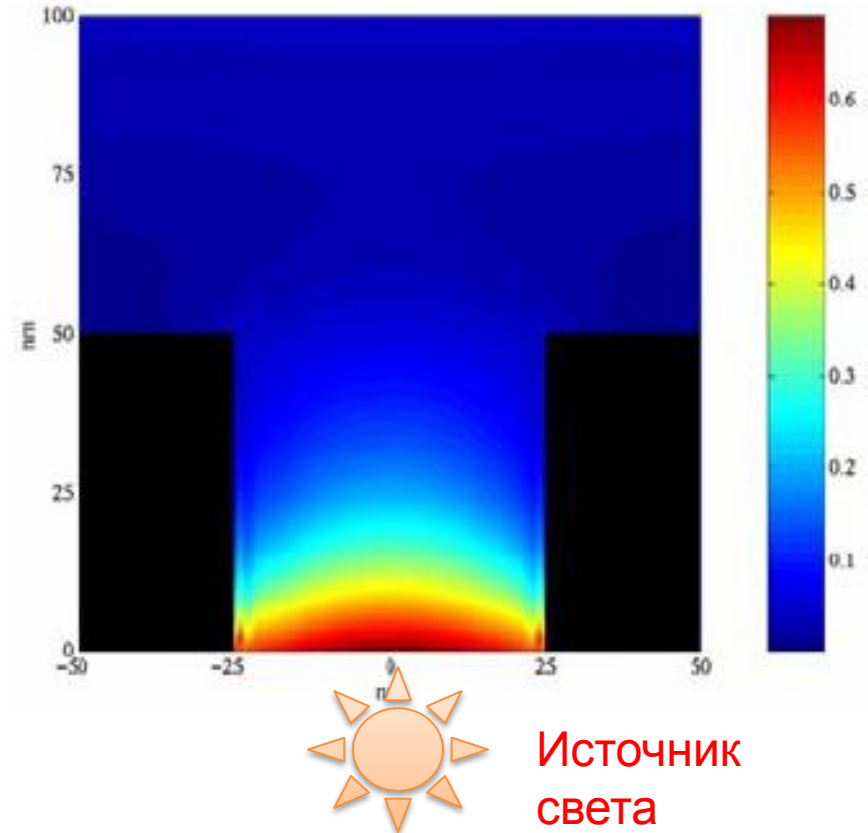
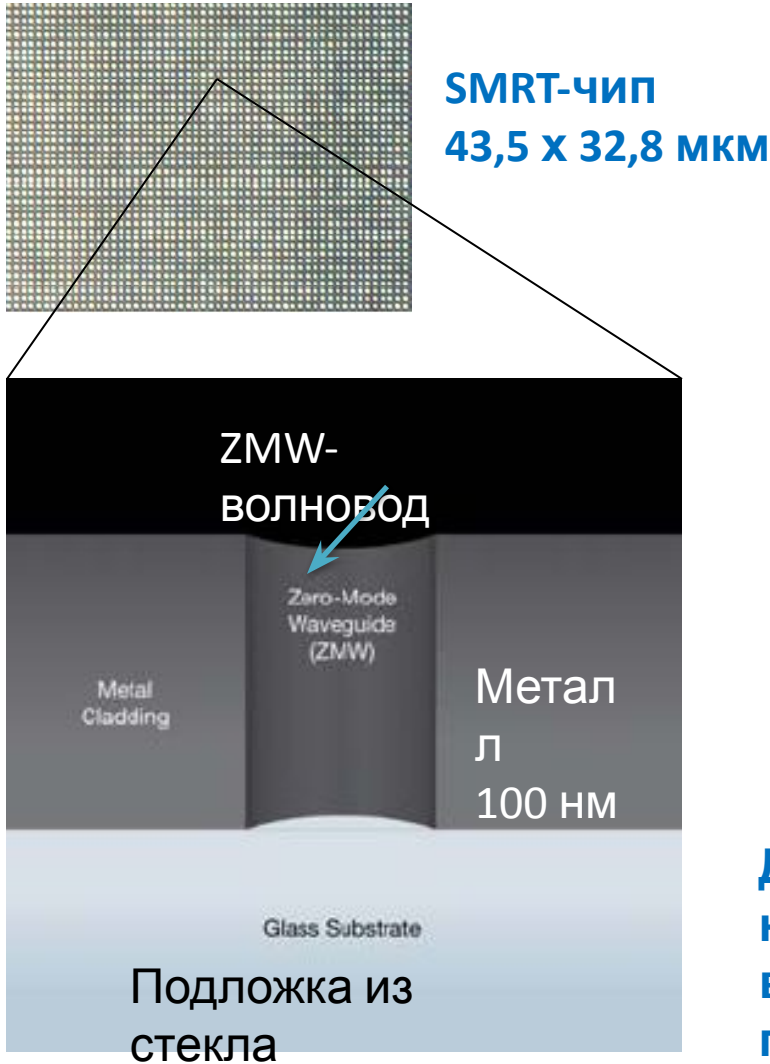


Phospholinked nucleotides  
(Pacific Biosciences)



Включение нуклеотида в ДНК сопровождается освобождением флуорофора

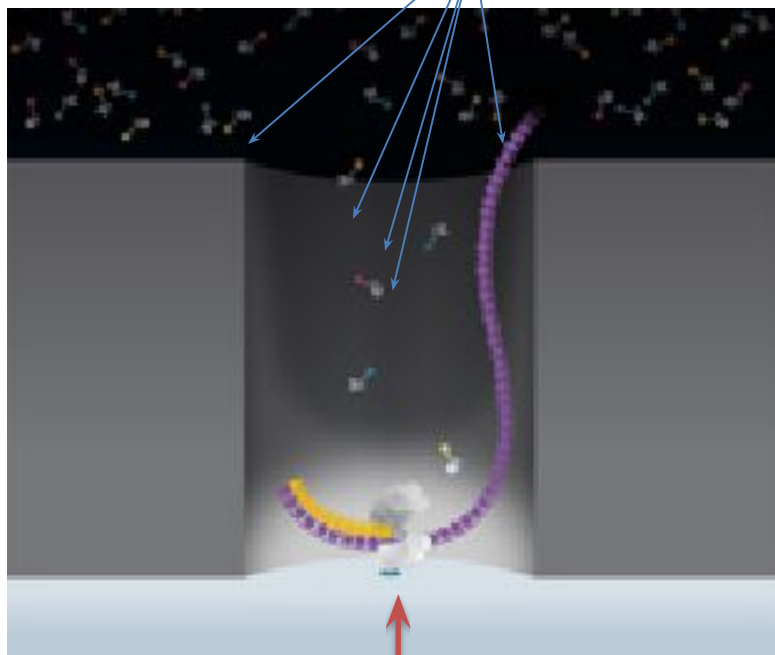
# Строение и принцип действия SMRT-чипа (Single Molecule Real Time Sequencing-chip)



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

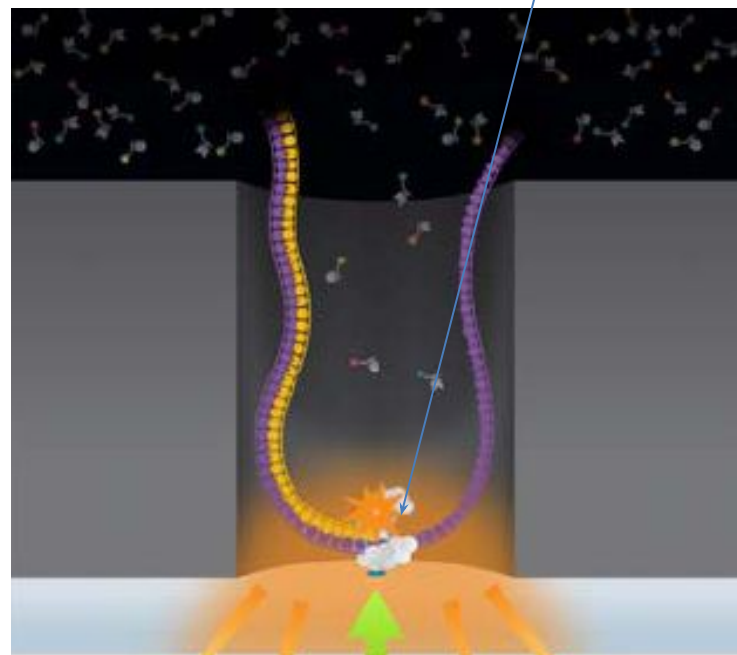
# Схема синтеза ДНК в ZMW-волноводе

Меченые dNTPs



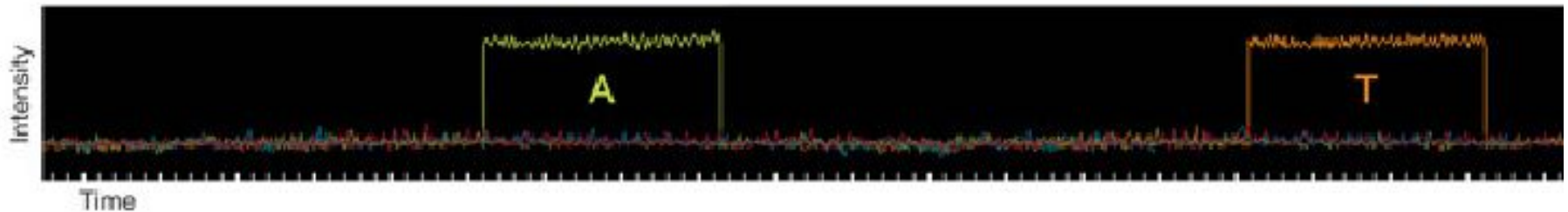
Одна молекула ДНК-полимеразы иммобилизована на дне каждого волновода

Включившийся dNTP



Эмиссия  
Возбуждения

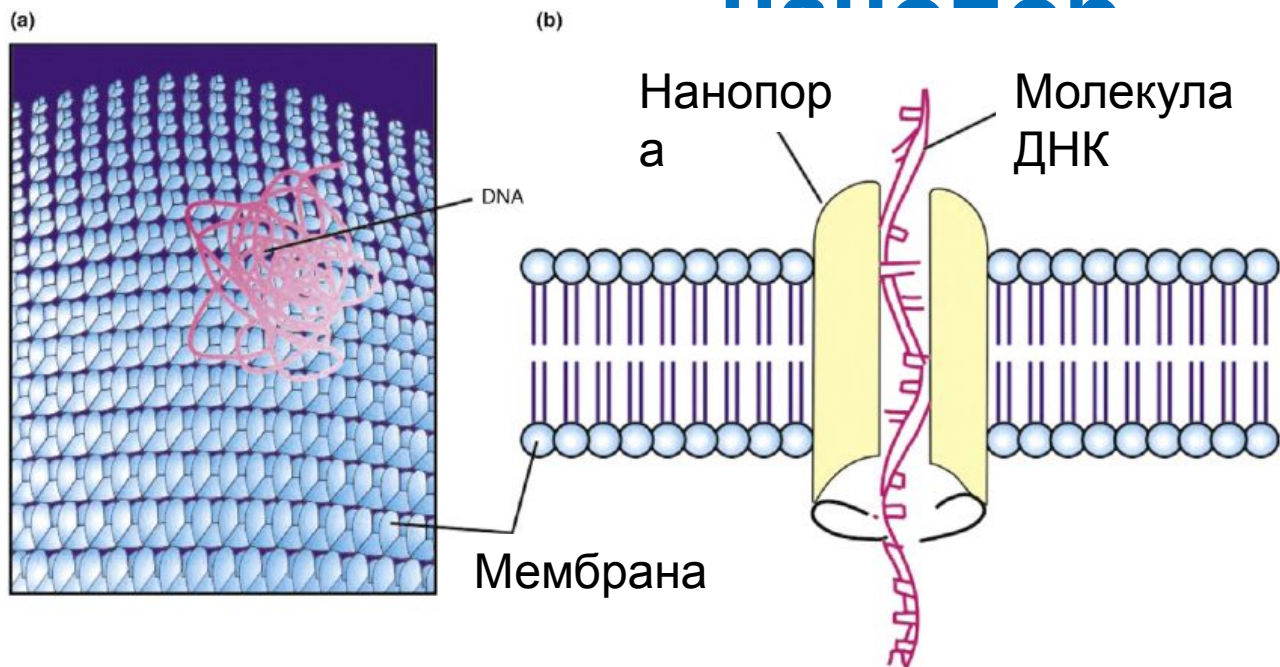
# Процесс секвенирования ДНК на SMRT-чипе



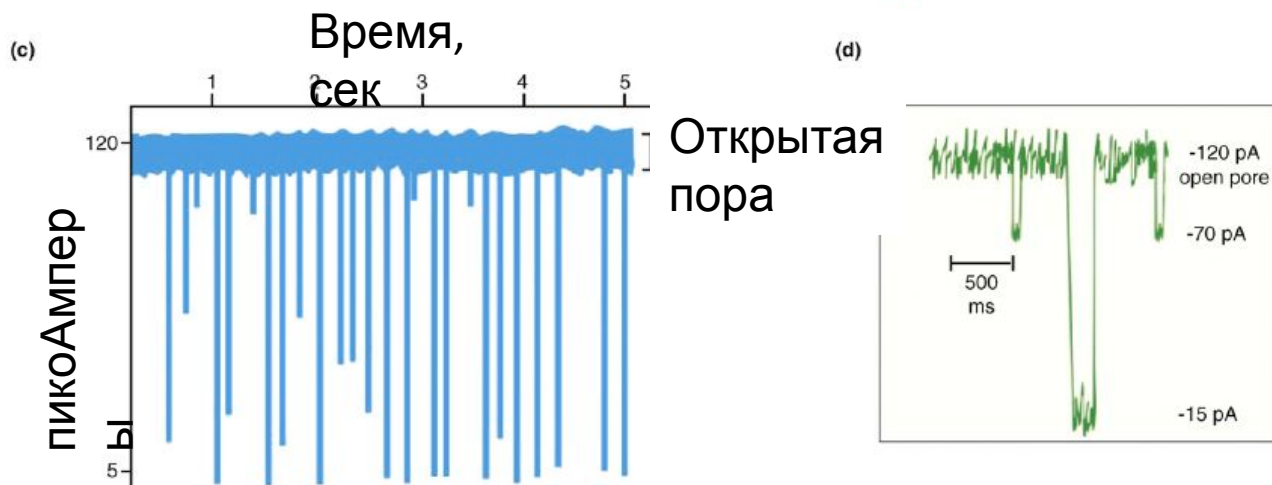
Включающийся в ДНК меченый нуклеотид задерживается в объеме считывания флуоресценции в течение миллисекунд, свободно диффундирующий нуклеотид – в течение наносекунд.

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

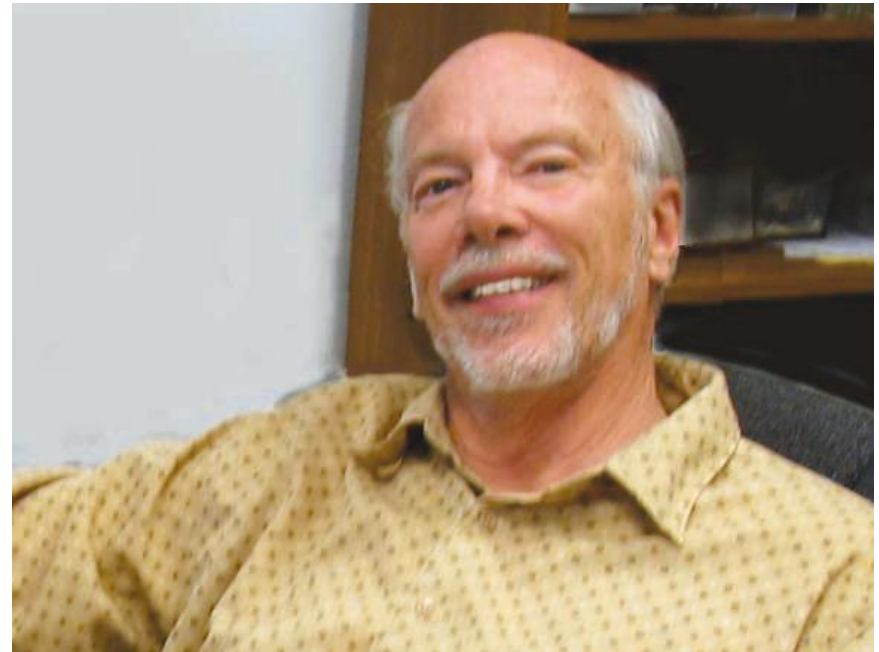




# Секвенатор третьего поколения фирмы Oxford Nanopore Technologies (2012 г)



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

