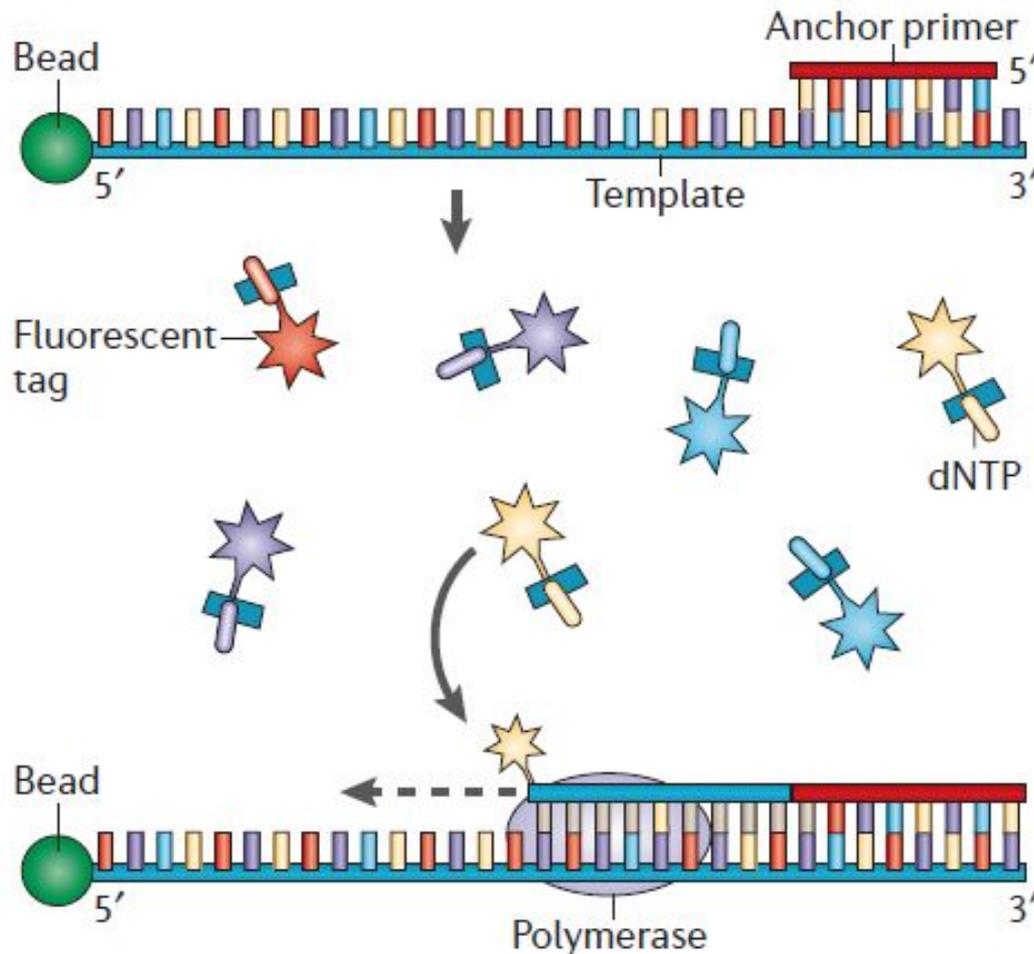


# Стратегии секвенирования кластеров ДНК в секвенаторах второго поколения

2.

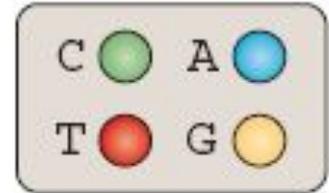
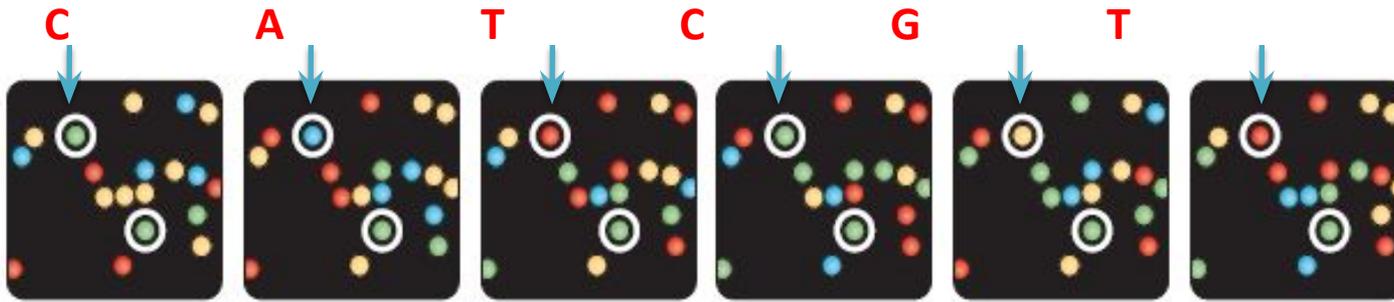
## Секвенирование синтезом (sequencing by synthesis – SBS)



- Включение флуоресцентного терминатора
- Считывание
- Деблокирование и удаление флуорофора



# Извлечение информации из неупорядоченных микроматриц при секвенировании ДНК



Каждый dNTP  
мечен своим  
флуорофором

Циклы: 1

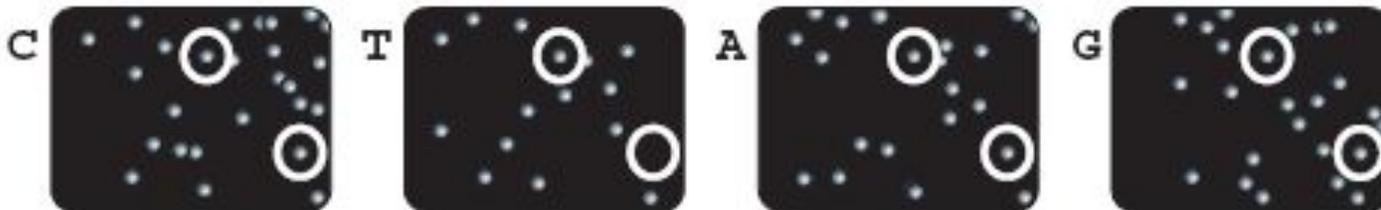
2

3

4

5

6



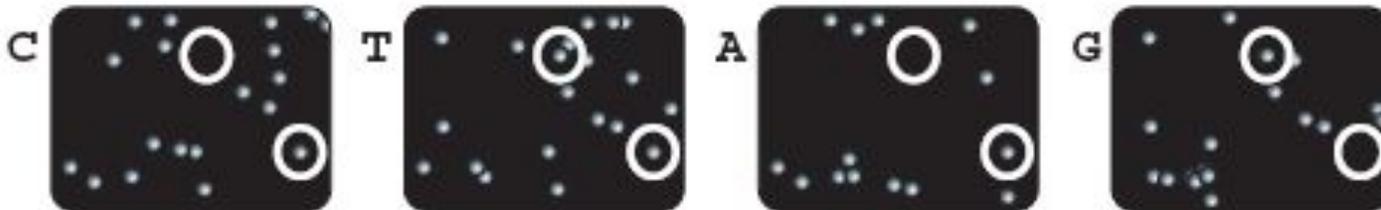
Все dNTPs  
мечены  
одним  
флуорофором

Циклы: 1

2

3

4



В каждом  
цикле  
добавляют  
только один  
dNTP

Циклы: 5

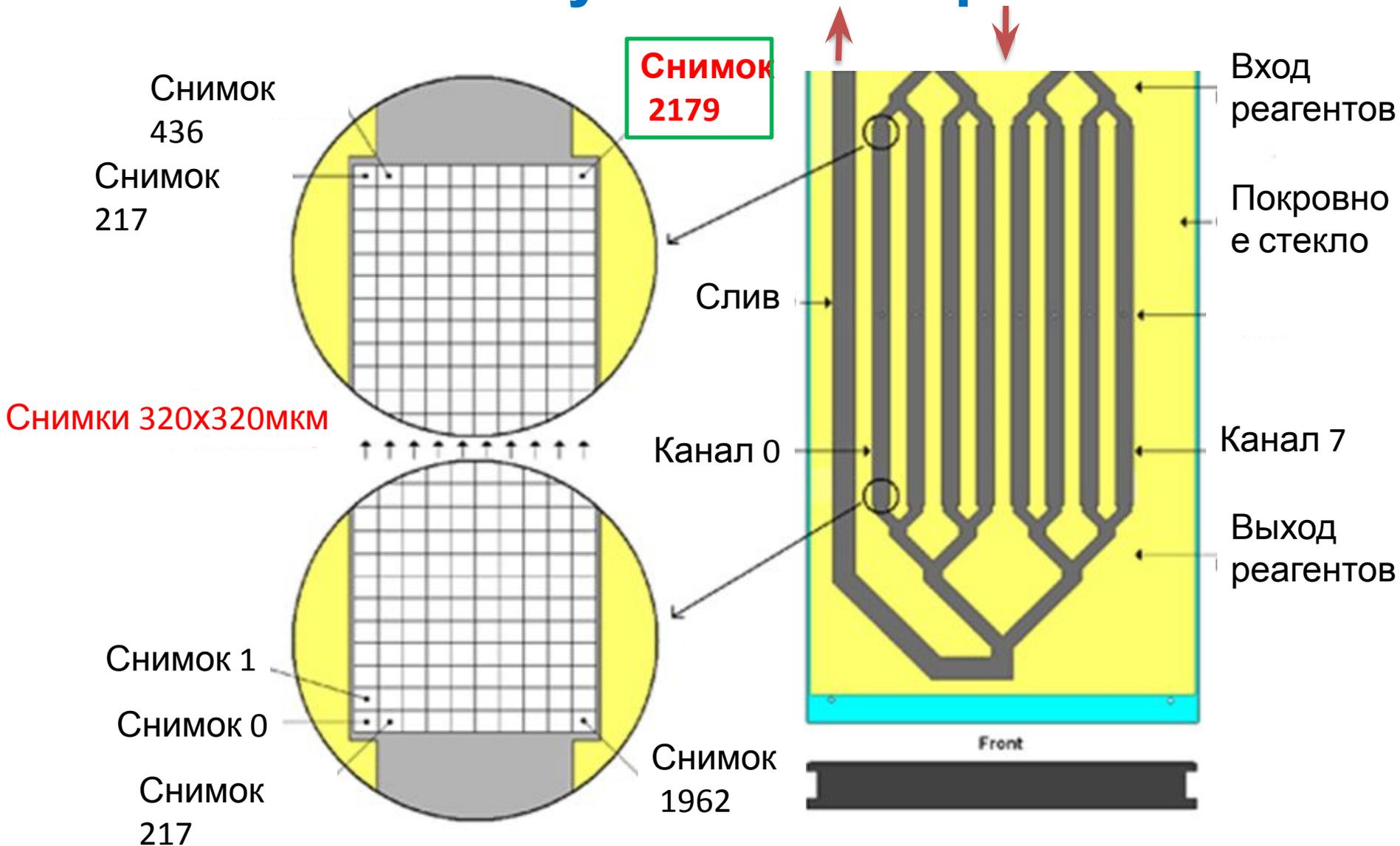
6

7

8

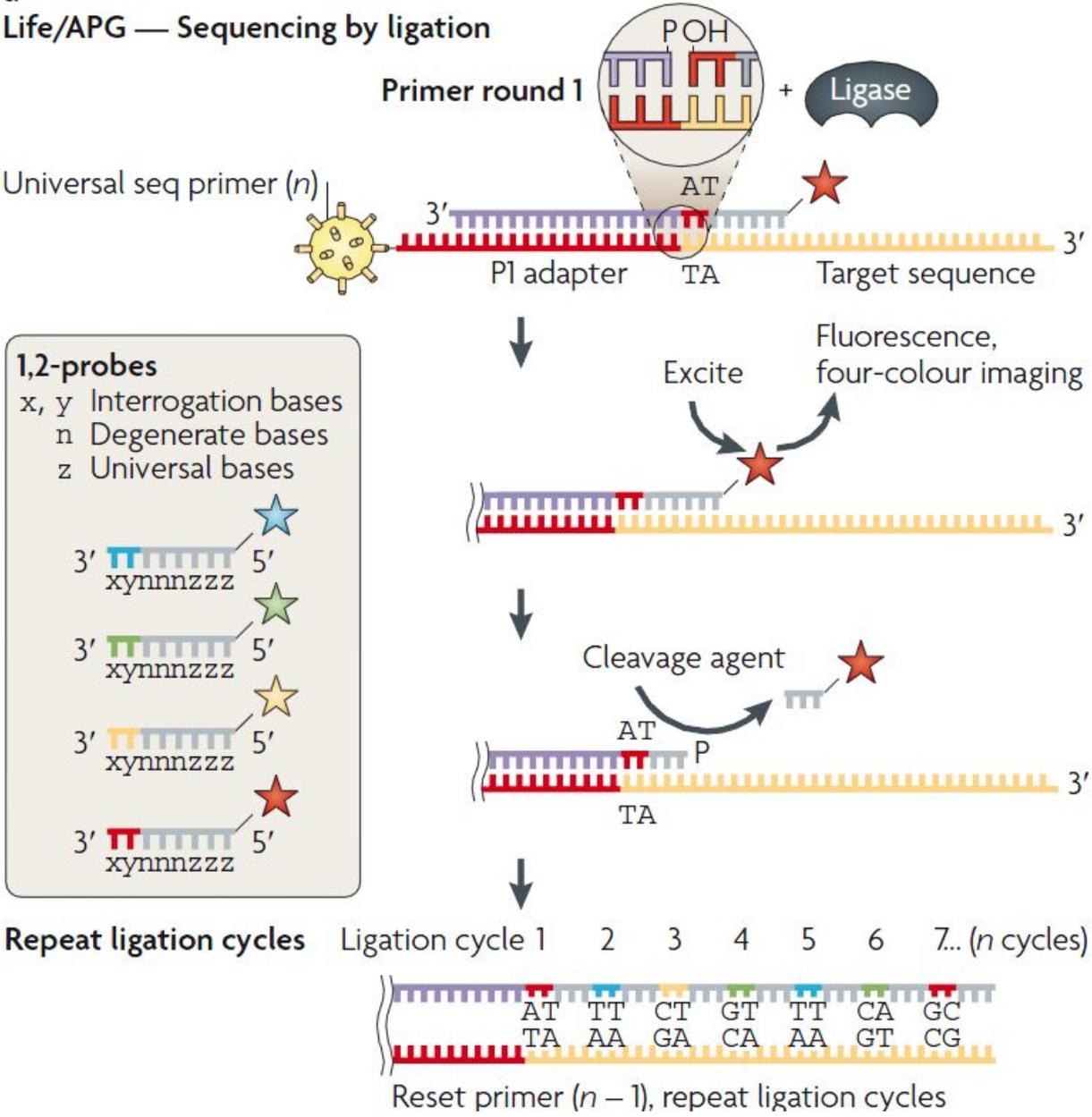
Последовательности, верхний ряд: **СТАГТГ**, нижний ряд:  
**САГСТА**

# Проточная ячейка Полонатора и схема получения изображений

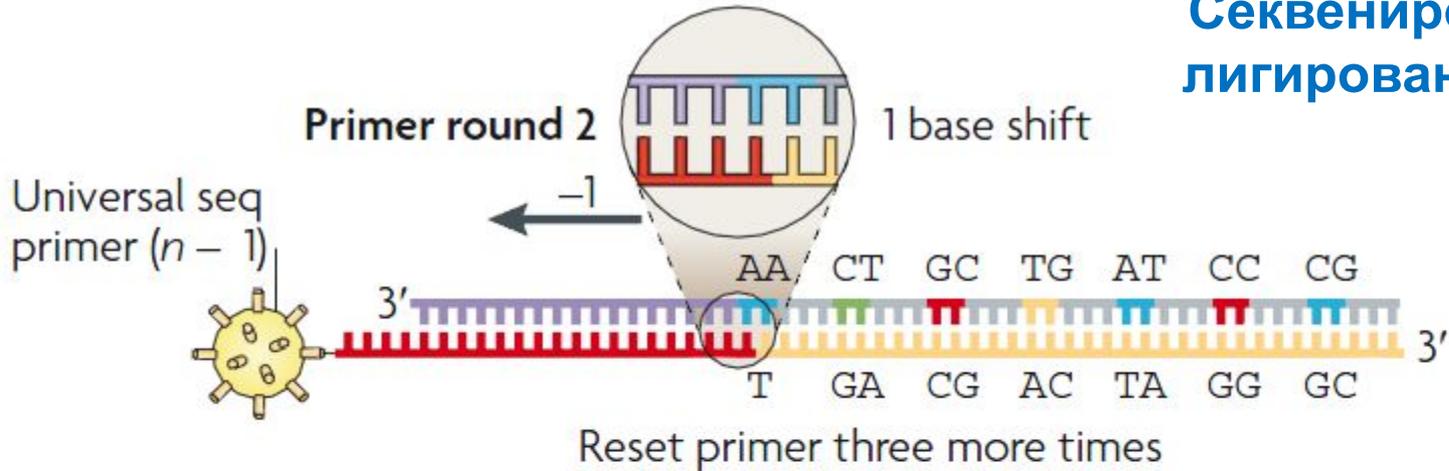


# Секвенирование игрированием (1)

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



# Секвенирование лигированием (2)

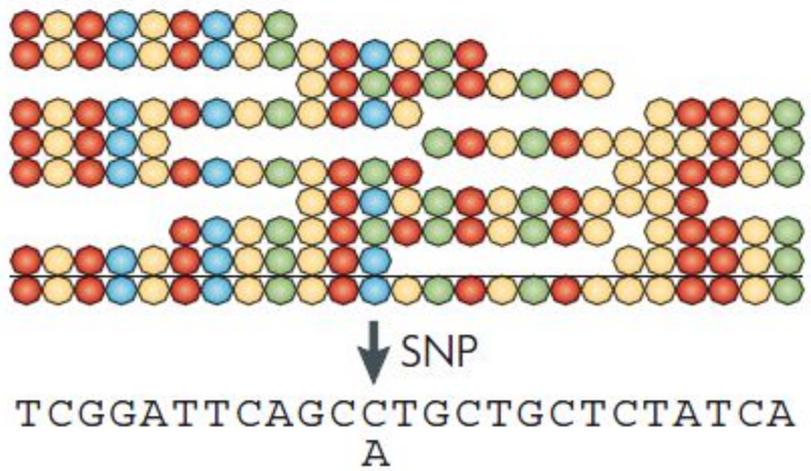


**b**

Two-base encoding: each target nucleotide is interrogated twice

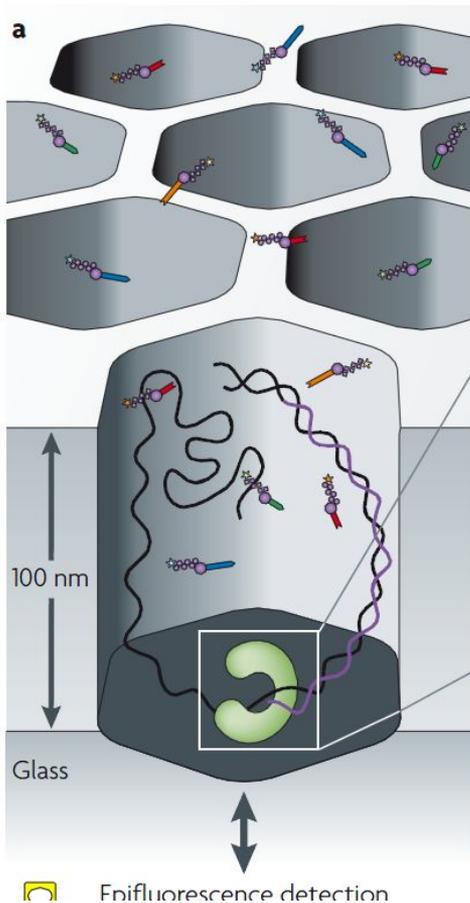
2nd base		Template sequence
1st base	A C G T	
A	● ● ● ●	ATACAAGA
C	● ● ● ●	CGCACCTC
G	● ● ● ●	GCGTGGAG
T	● ● ● ●	TATGTTCT

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

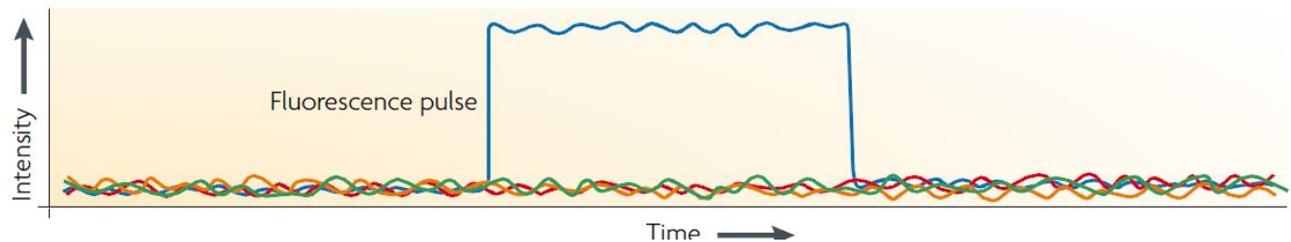
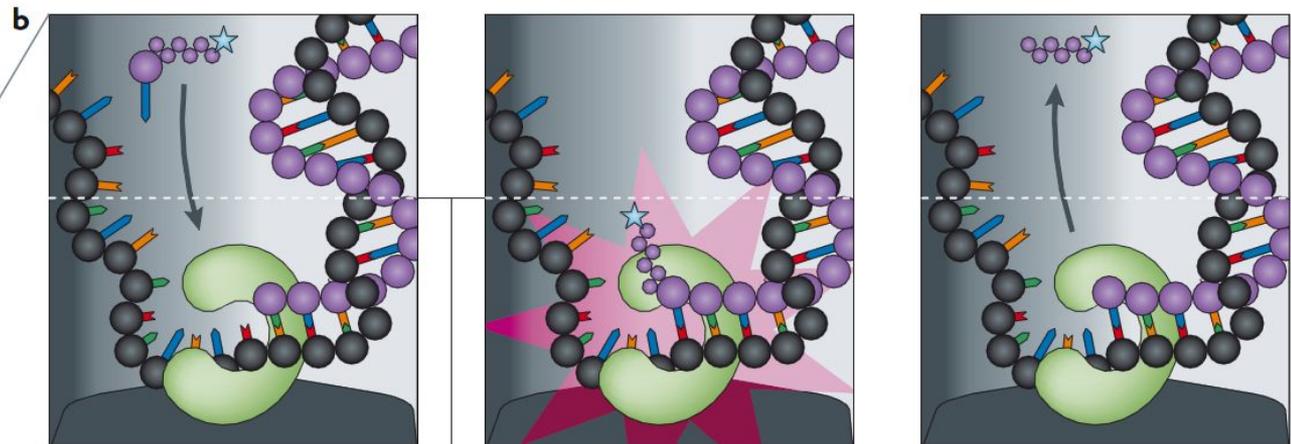


# Секвенатор третьего поколения фирмы Pacific Biosciences

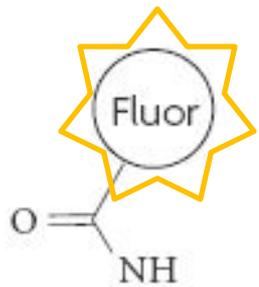
Pacific Biosciences — Real-time sequencing



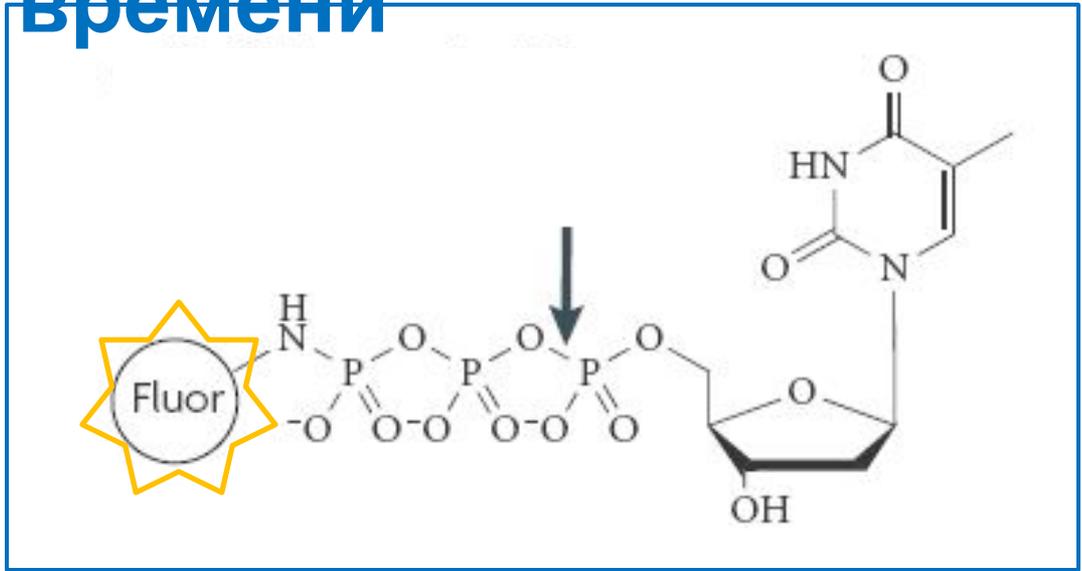
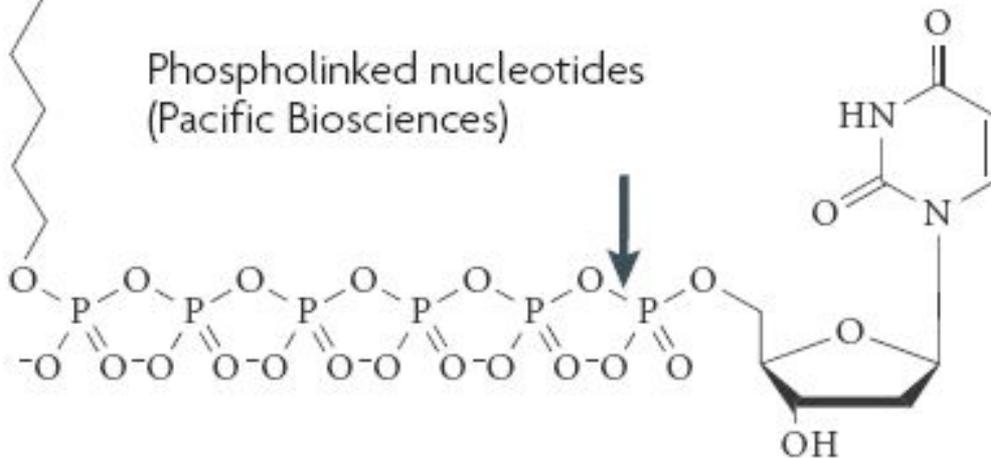
Phospholinked hexaphosphate nucleotides



# Производные нуклеотидов для измерения флуоресценции в реальном времени

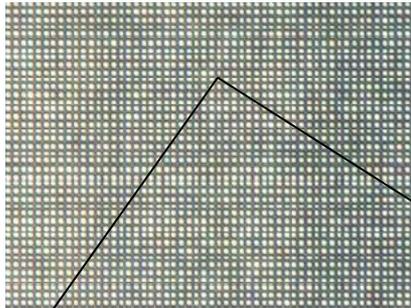


Phospholinked nucleotides  
(Pacific Biosciences)

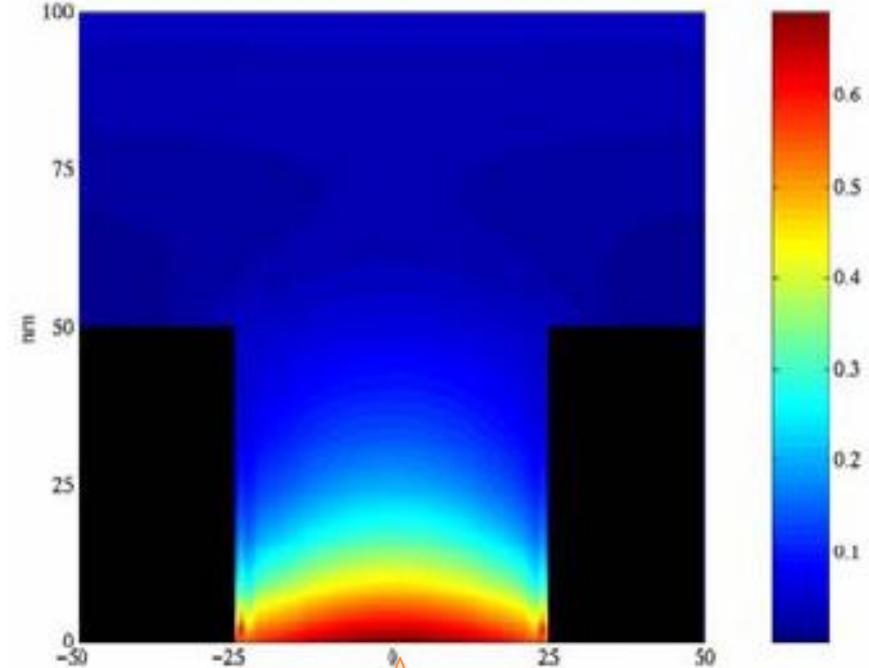


**Включение нуклеотида в ДНК сопровождается освобождением флуорофора**

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



SMRT-чип  
43,5 x 32,8 мкм

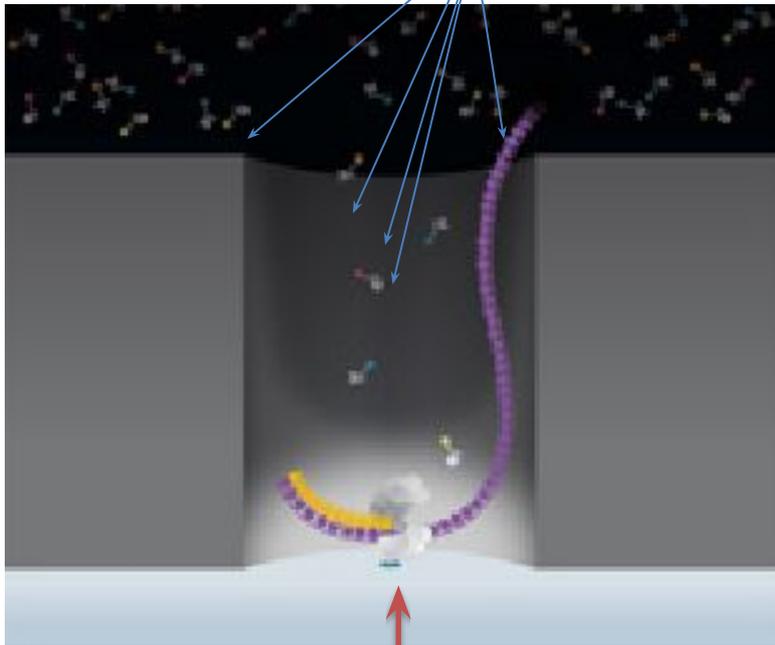


Источник  
света

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

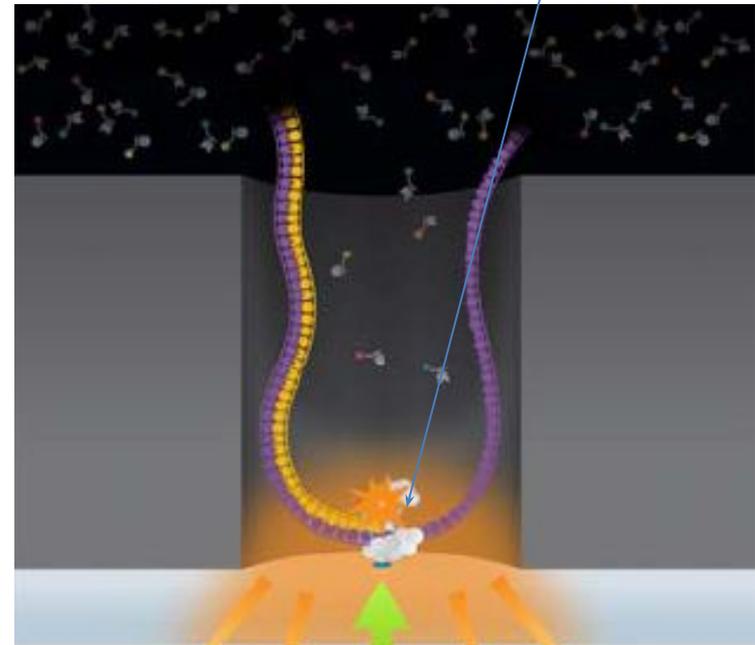
# Схема синтеза ДНК в ZMW-волноводе

Меченые dNTPs



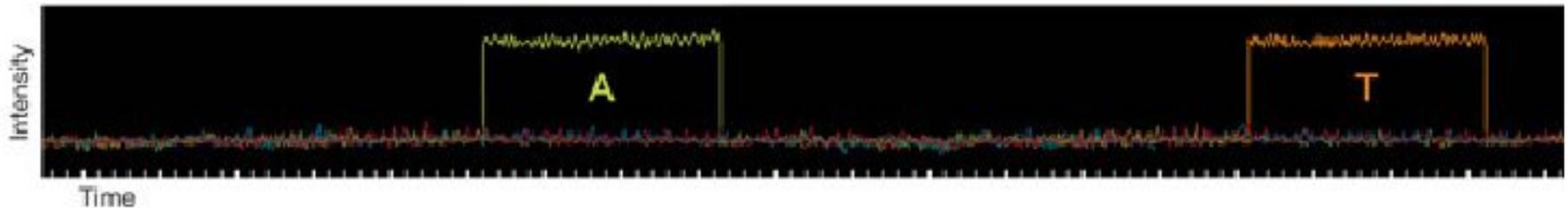
Одна молекула ДНК-полимеразы иммобилизована на дне каждого волновода

Включившийся dNTP



Эмиссия  
Возбуждения

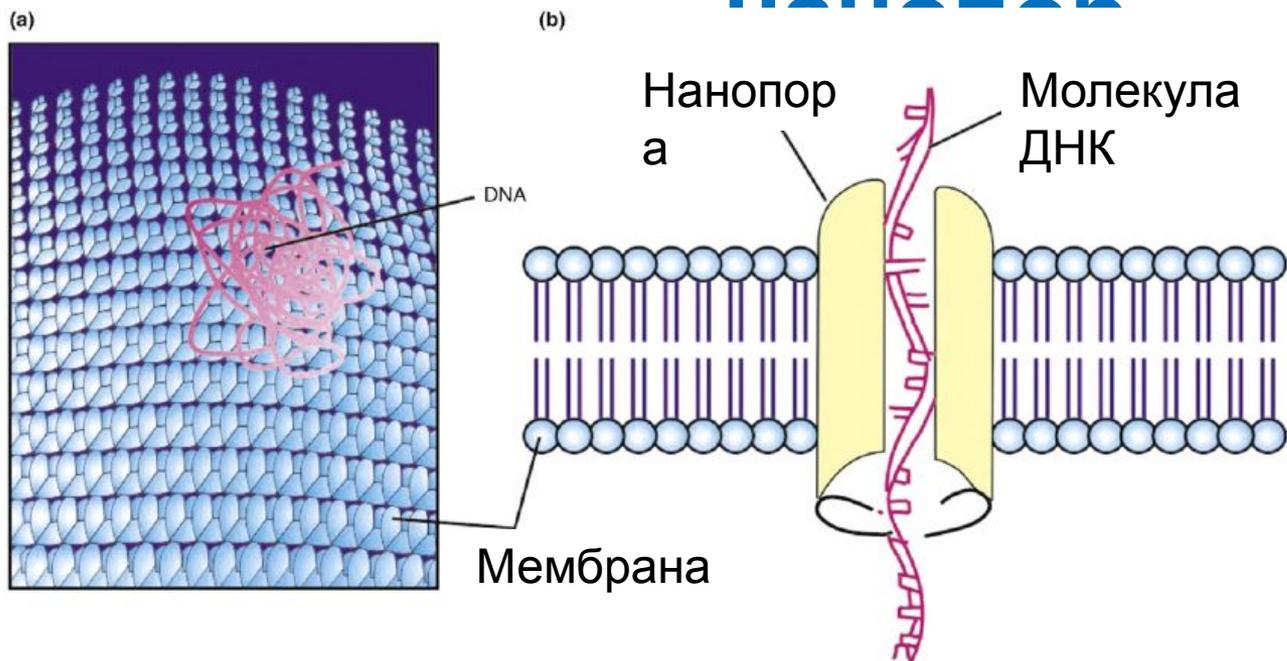
# Процесс секвенирования ДНК на SMRT-чипе



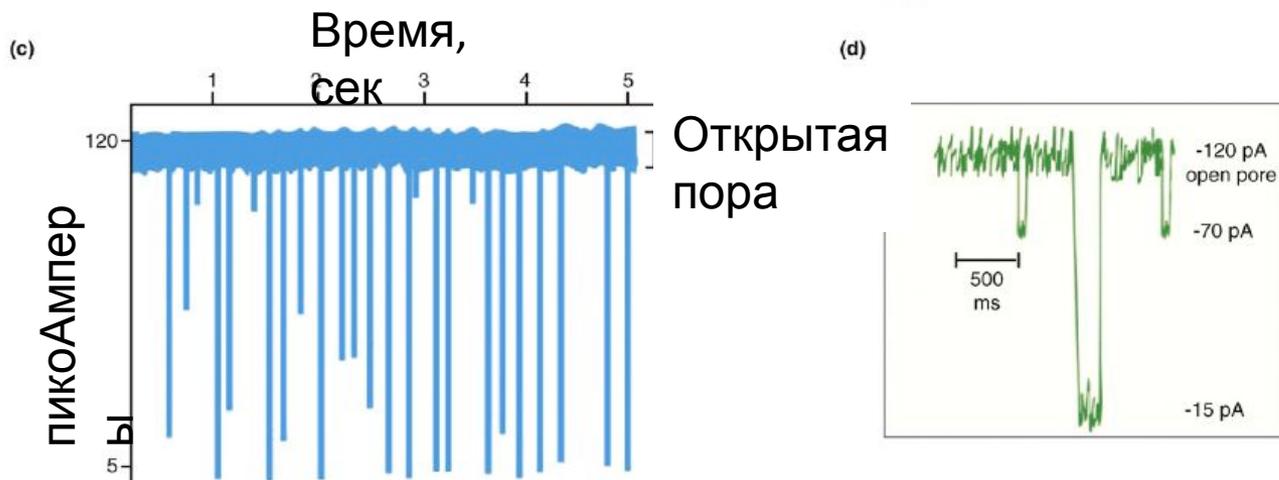
Включающийся в ДНК меченый нуклеотид задерживается в объеме считывания флуоресценции в течение миллисекунд, свободно диффундирующий нуклеотид – в течение наносекунд.

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

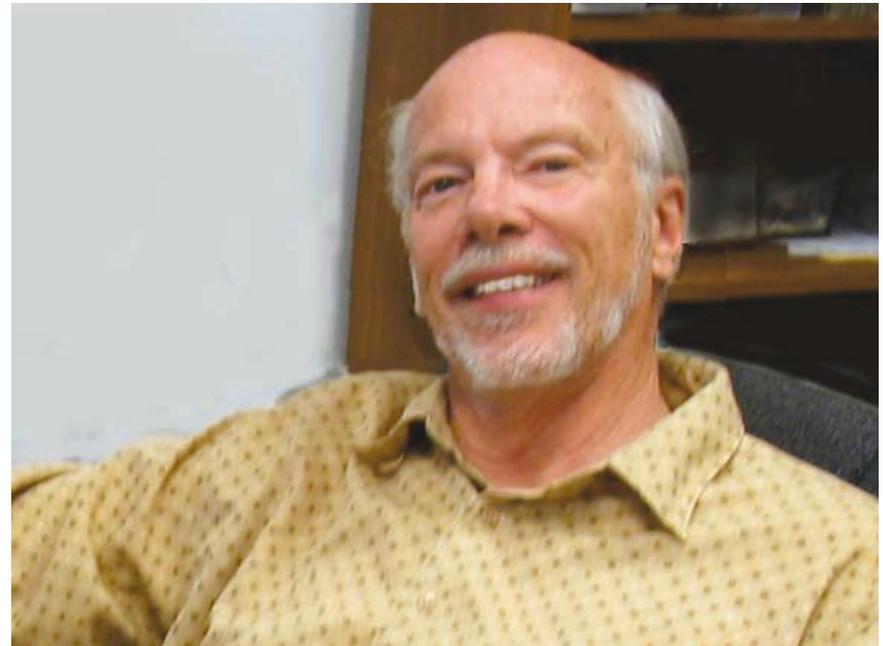
# Профиль изменений силы электрического тока во времени при секвенировании ДНК с использованием нанопор



# 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

