

ДНК секвенирлеу әдістері

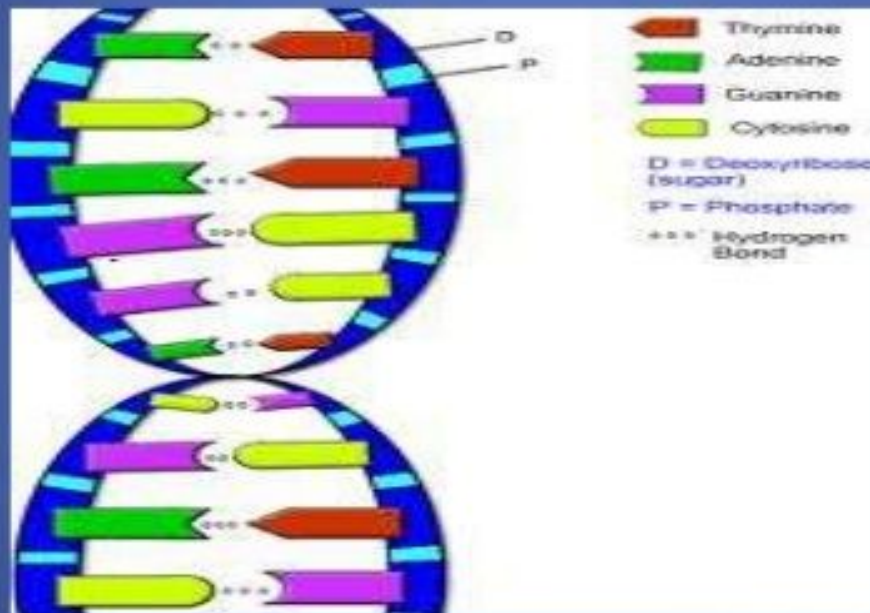
- Биополимерлердің бірінші реттілігін анықтайтын әдісте *секвенирлеу* деген арнайы термин қолданылады.
- Белгілі ДНК молекуласындағы нуклеотидтердің санын мен ретін жалғыз-жалғыздан ретті түрде ыдырауы арқылы анықтауға болады.

ДНК секвенерлеу әдісінің қолдануы:

- Геномдық анализ
- Медицина
- Микороганизмдердің метагеномикалық
анализы

What is DNA Sequencing?

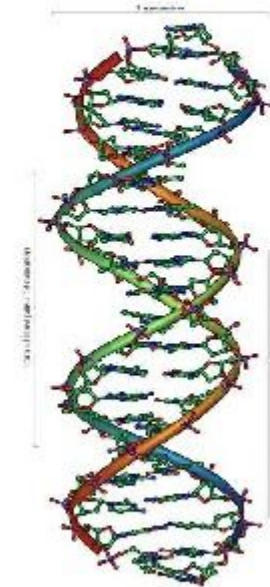
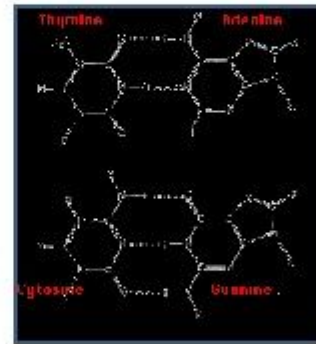
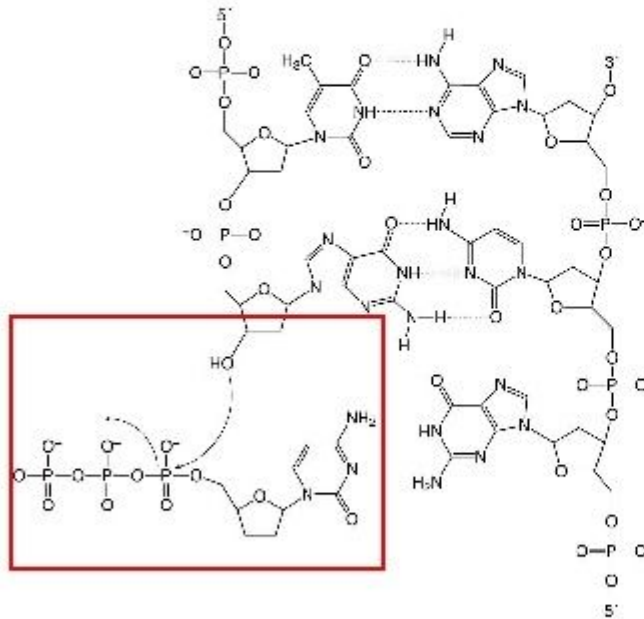
- DNA Sequencing is finding the order of nucleotides in a fragment of DNA



- These 4 bases are cytosine, guanine, adenine, or thymine.

Фосфодиэфирлік байланыстар

- ДНК полимераза

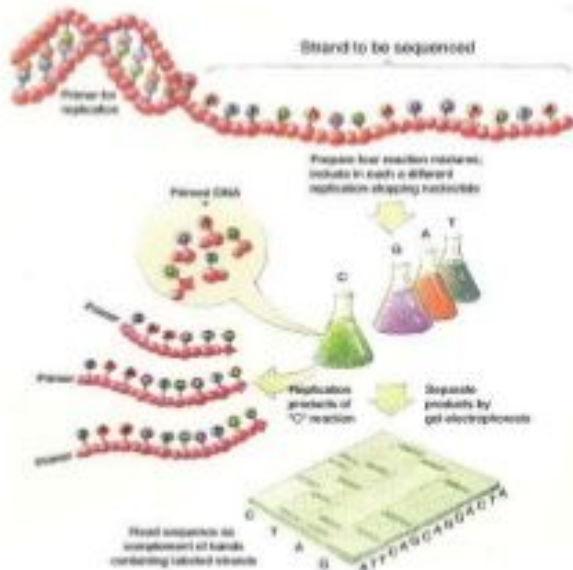


ERA OF SEQUENCING

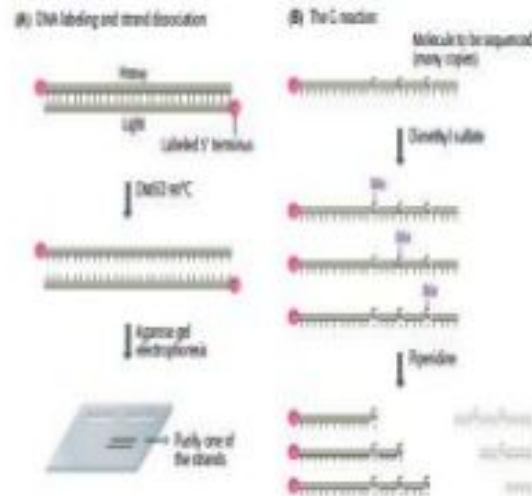
1st Generation sequencing

- Sequence *many* identical molecules
- Sequencing in large gels or capillary tubing limits scale

Sanger Chain Termination
(1977)



Maxam- Gilbert Sequencing
(1977)



ABI PRISM 377



ERA OF SEQUENCING

5

1st Generation Sequencing

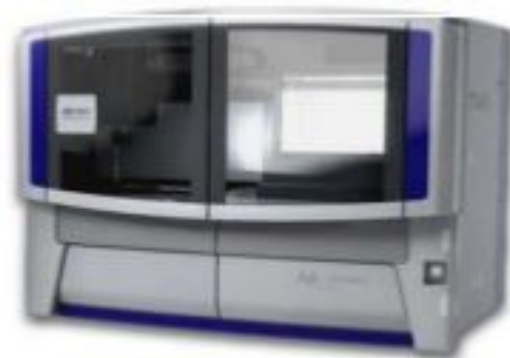
- Sequence *many* identical molecules
- Sequencing in large gels or capillary tubing limits scale



Illumina MiSeq

2nd Generation Sequencing

- Sequence *millions* of clonally amplified molecules per run
- Using a reversible, stepwise sequencing chemistry
- *Immobilized* on a surface



Life Technologies/Applied Biosystems; SOLID 5500



QIAGEN GeneReader



Roche / 454 Pyrosequencer

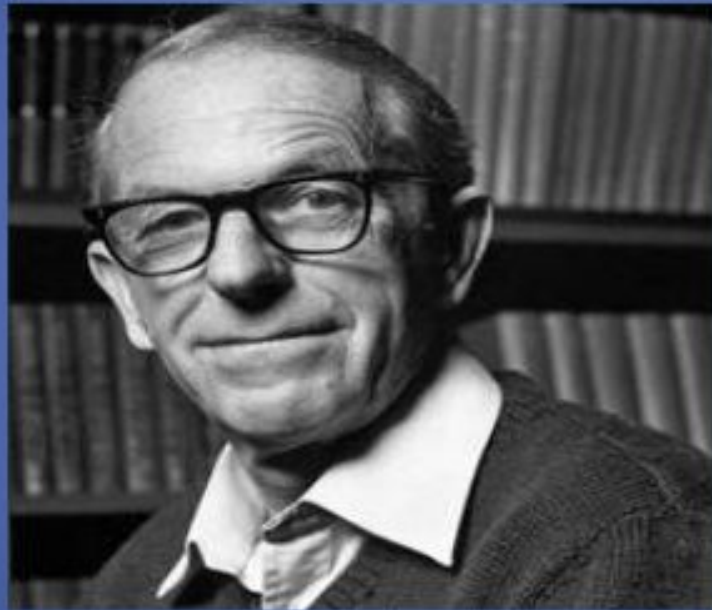
NEXT GENERATION SEQUENCING

- ✦ High throughput DNA Sequencing Technique.
- ✦ Employs Micro and Nanotechnologies
 - Reduce sample size.
 - Low Reagent cost
 - Less Time
- ✦ Massive Parallel Sequencing
- ✦ Sequence thousands of sequences at once.
- ✦ Produce enormous amount of data .



History of DNA Sequencing

- This method was founded in 1975 by Frederick Sanger



- This method was named after him and called Sanger Sequencing

Сэнгер әдісі: «терминатор» әдісі.

- 4 кезең:
 1. Денатурация
 2. Синтез
 3. Терминация
 4. Электрофорез

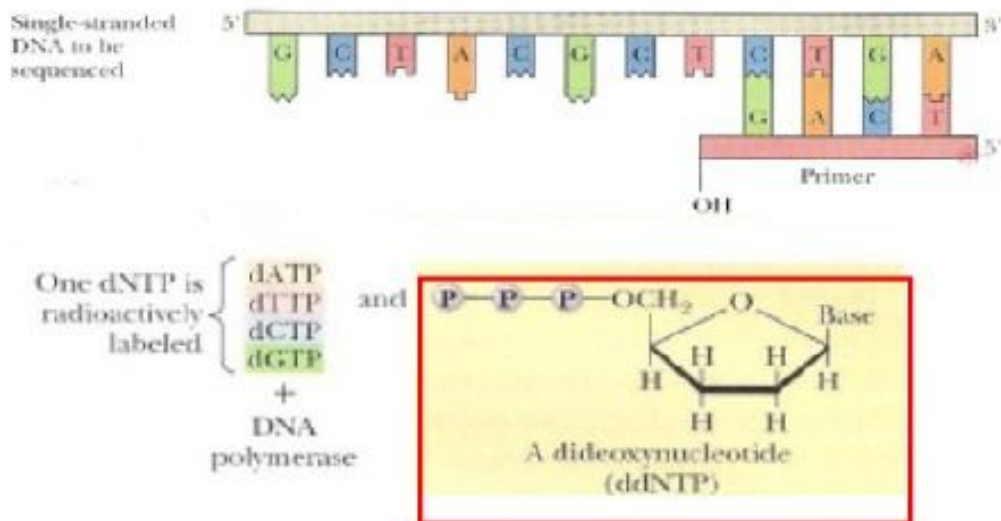
Сэнгер әдісі: «терминатор» әдісі.

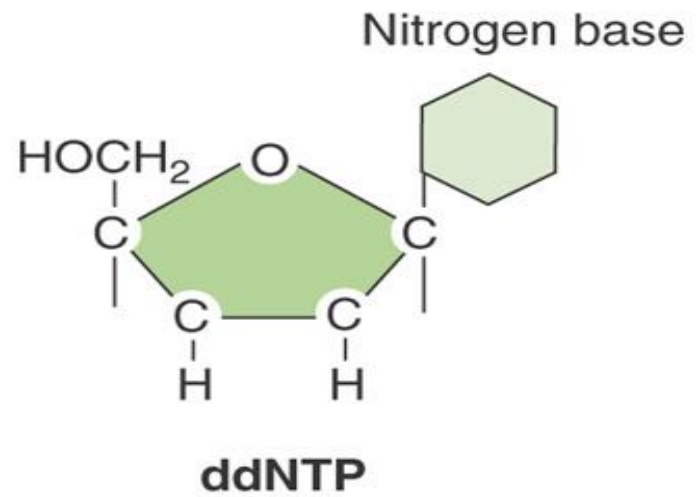
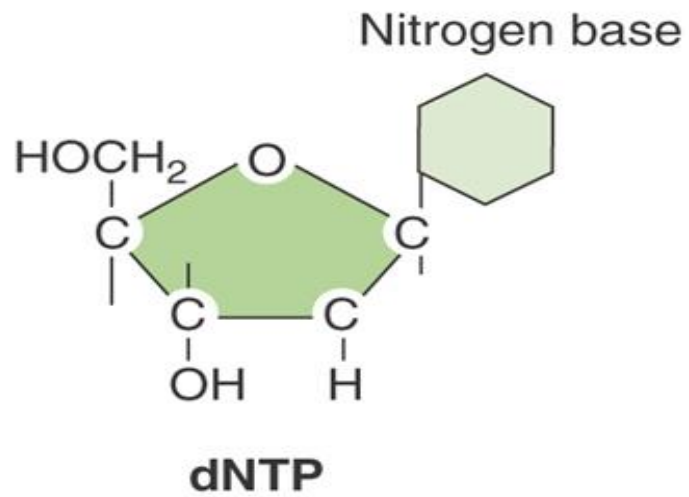
- Терминирующий агент – ddNTP
- 4 пробирки содержат все компоненты для копирования ДНК:
 - Матрицу ДНК,
 - праймер,
 - DNA-pol,
 - dNTP's (один из которых радиоактивно мечен по α -положению фосфата)
 - Один из ddNTP



Сэнгер әдісі

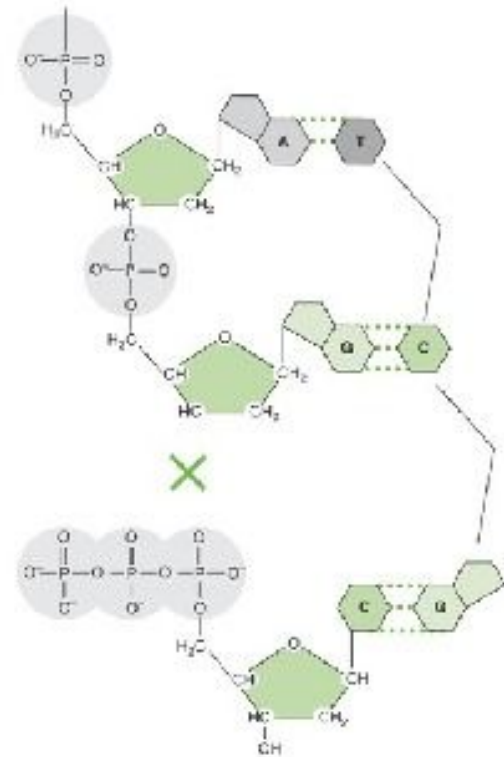
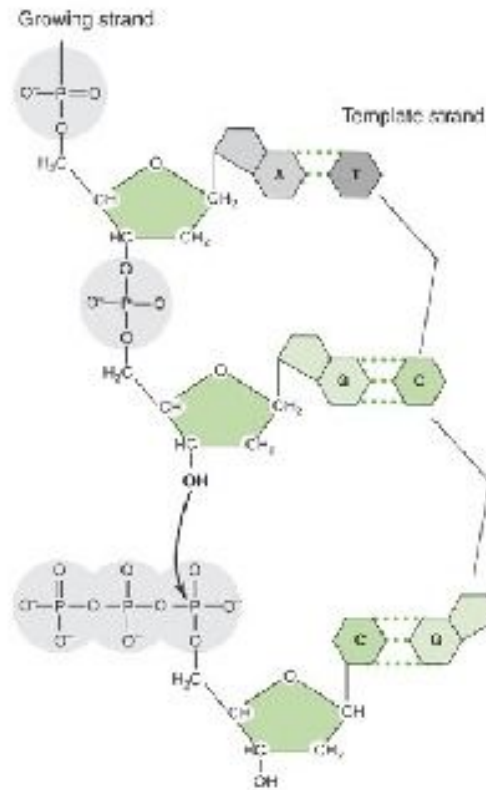
- ddNTP- 2',3'-дидеоксинуклеотид
- 3' гидрооксил группасы жок
- ДНК-полимераза ферменті қолданылады

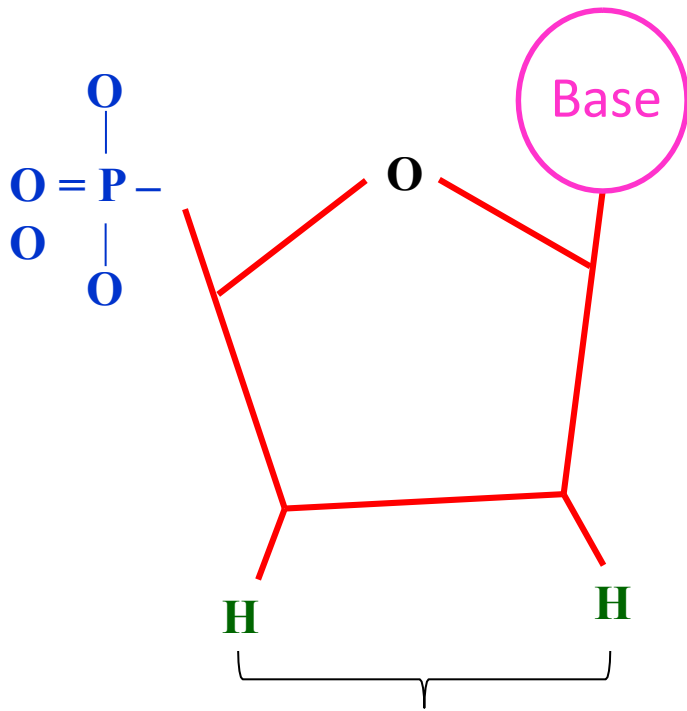




Сэнгер әдісі

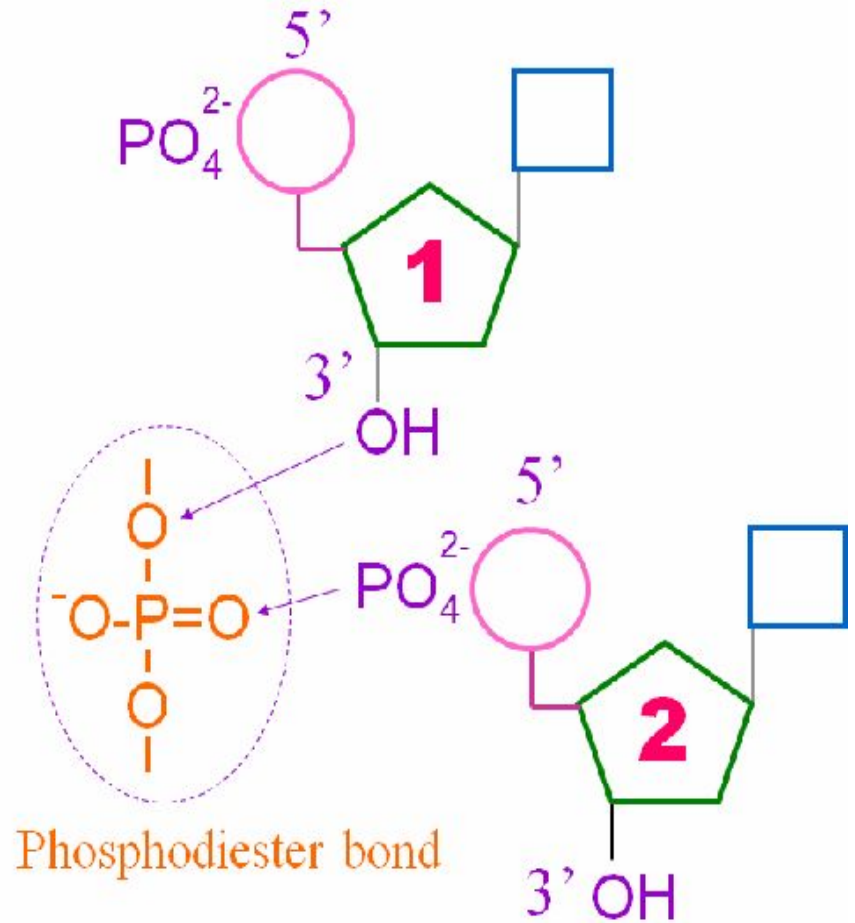
- Фосфодиэфирлік қатынасына қажет 3'-ОН группасы ddNTPs жоқ.





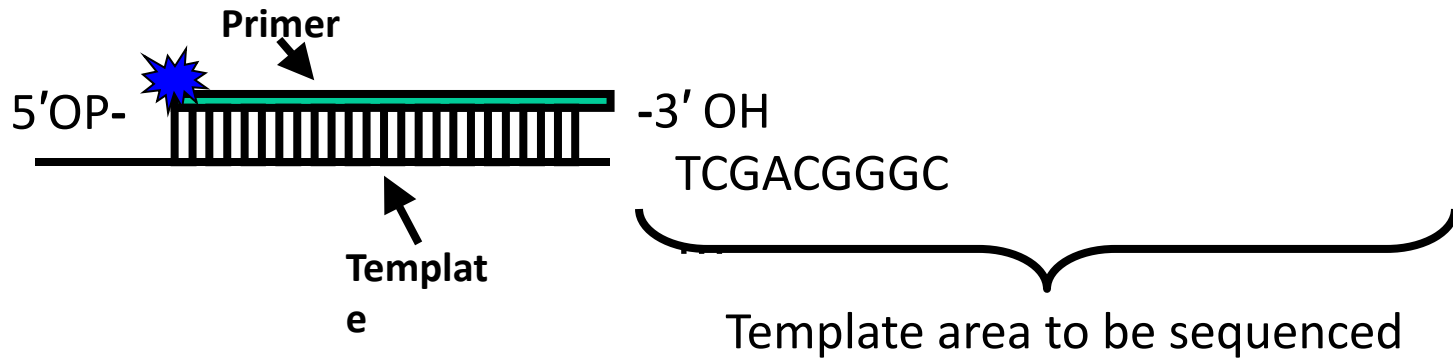
2', 3' dideoxy nucleotide

Can not form phosphodiester bound with next coming dNTP



Сэнгер әдісі

- Белгіленген праймер мен бастапқы матрицаны қосу.



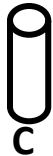
- ddNTP-ді 4 пробирканың біріне қосуы.

Сэнгер әдісі



ddATP +
four dNTPs

ddA
dAdGdCdTdGdCdCdG



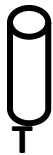
ddCTP +
four dNTPs

dAdG**ddC**
dAdGdCdTdG**ddC**
dAdGdCdTdGdC**ddC**
dAdGdCdTdGdCd**ddC**



ddGTP +
four dNTPs

dA**ddG**
dAdGdCdT**ddG**
dAdGdCdTdGdCdCd**ddG**

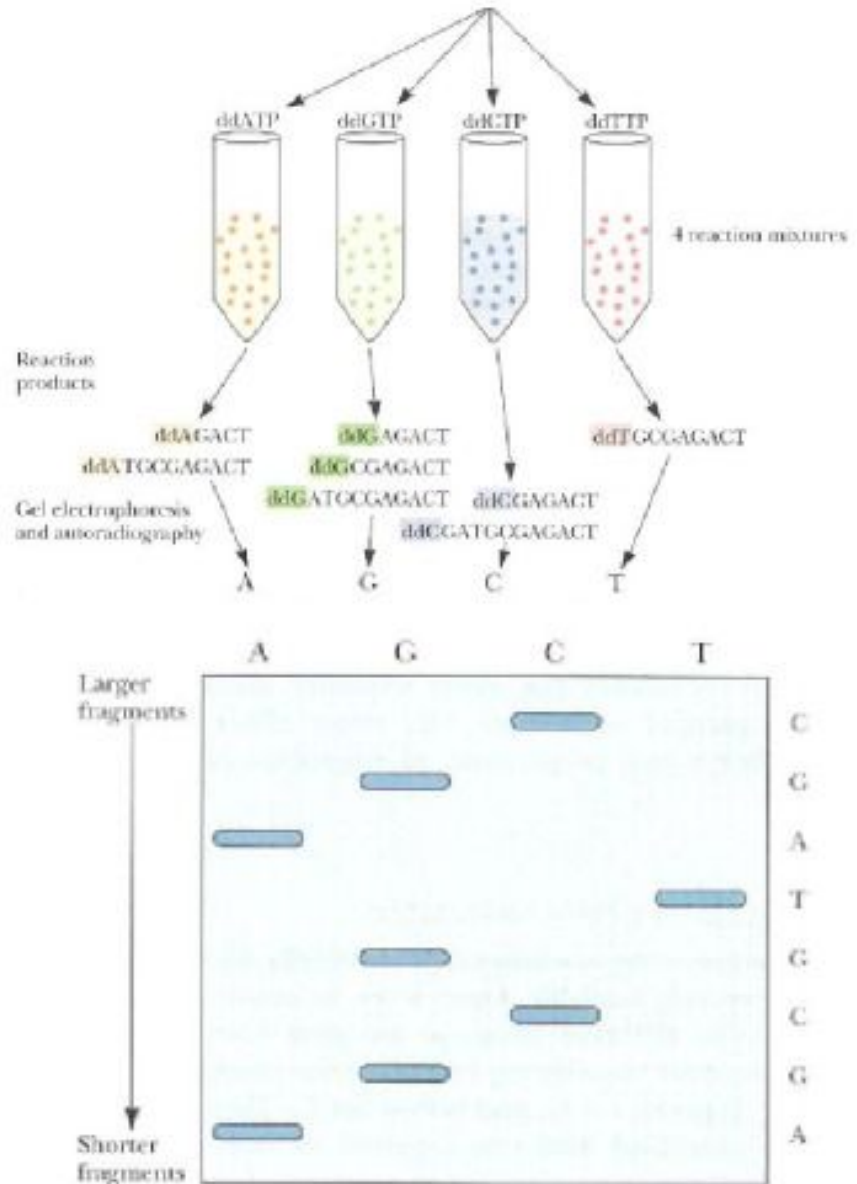


ddTTP +
four dNTPs

dAdGdC**ddT**
dAdGdCdTdGdCdCdG

Сэнгер әдісі

- 4 түрлі реакция әртүрлі ddNTPs қоспасымен
- Осы 4 қоспа гельдің 4 түрлі коланкасында электрофорез жүргүзүледі
- Гельдің нәтижелері астынан үстіге қарай оқылады



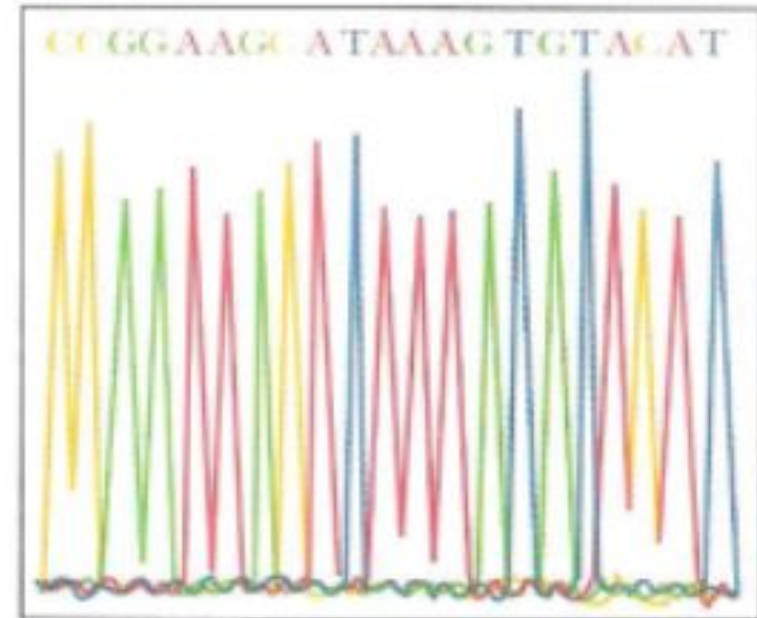
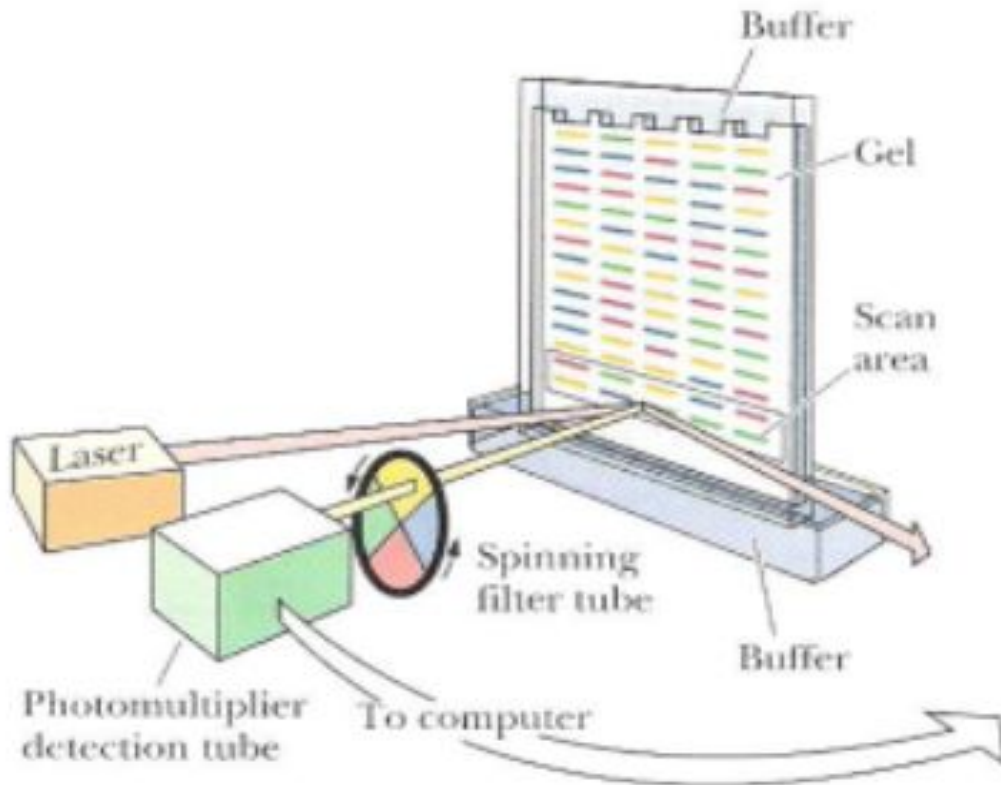
Метод «терминаторов»

- Можно заменить радиоактивную метку 4 флуоресцентными и ставить реакцию в одной пробирке
- Форез можно проводить в капилляре

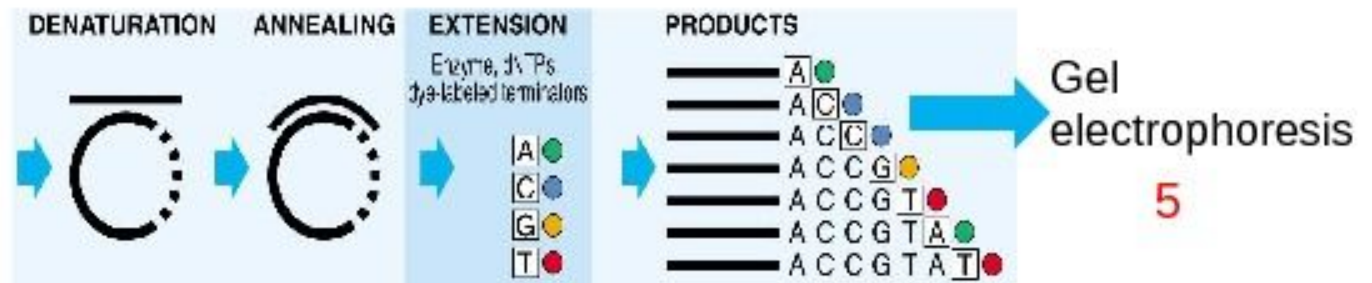
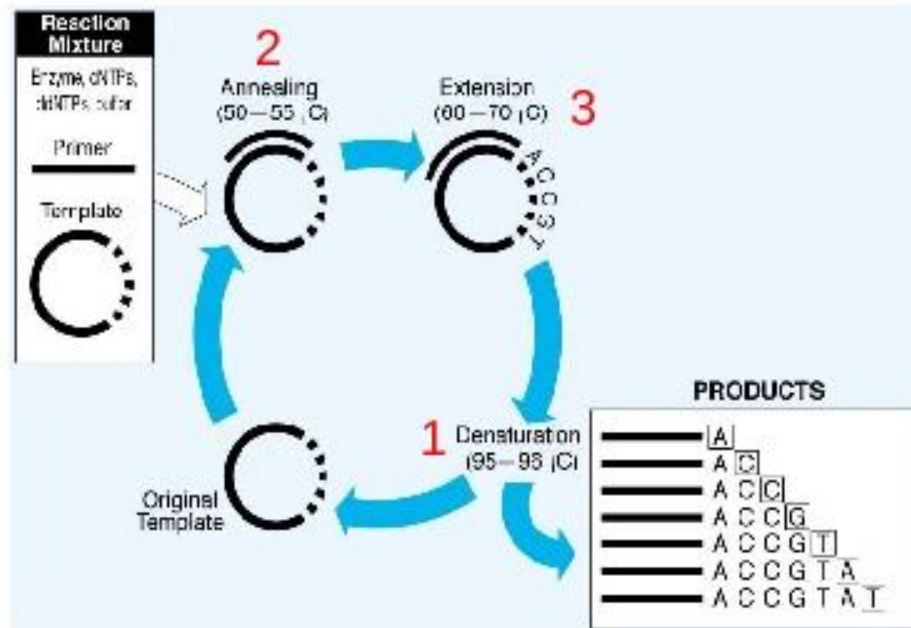


Applied Biosystems 3130

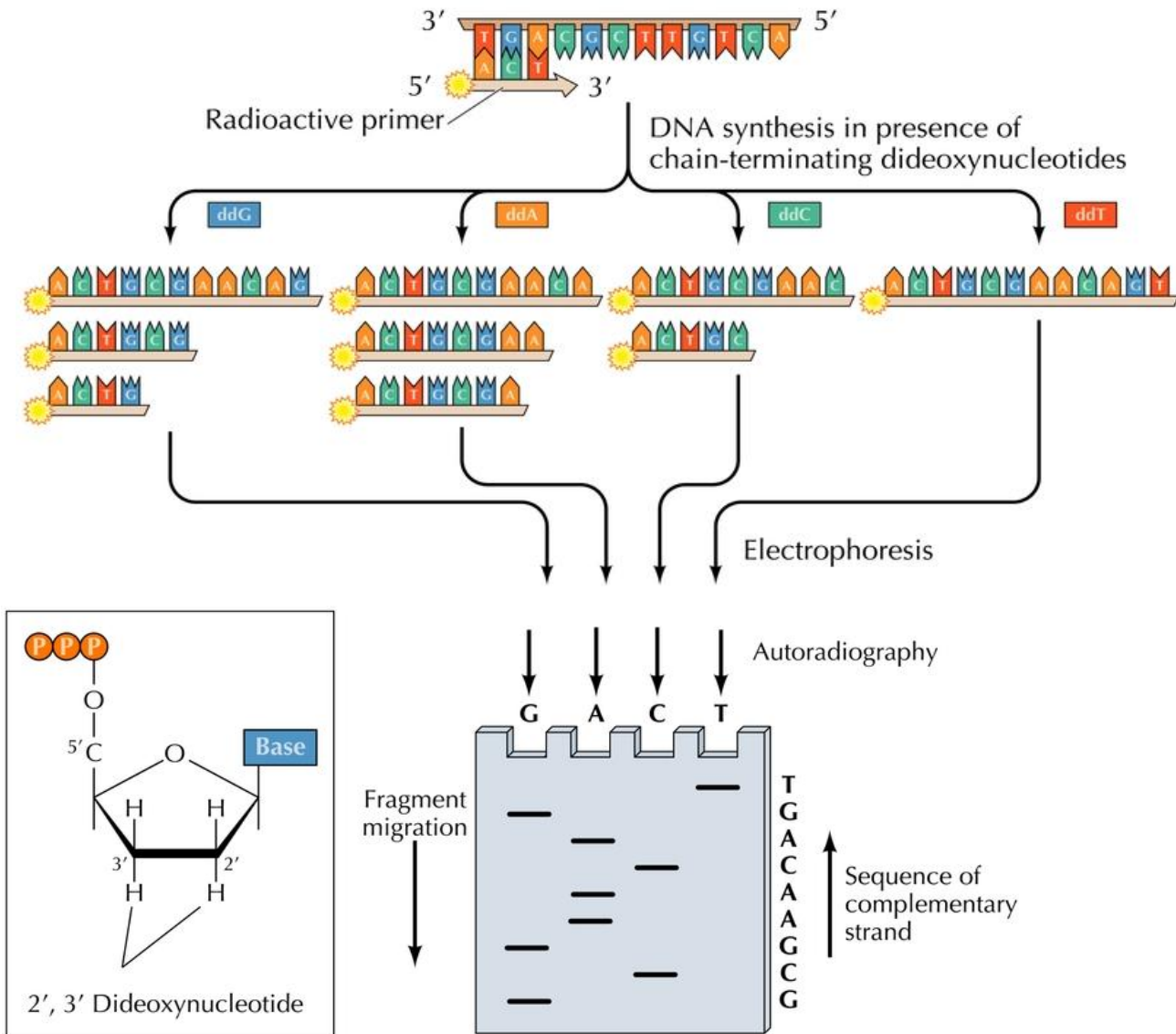
Automated Version of the Dideoxy Method



Сэнгер әдісінің схематикалық көрсетілуі

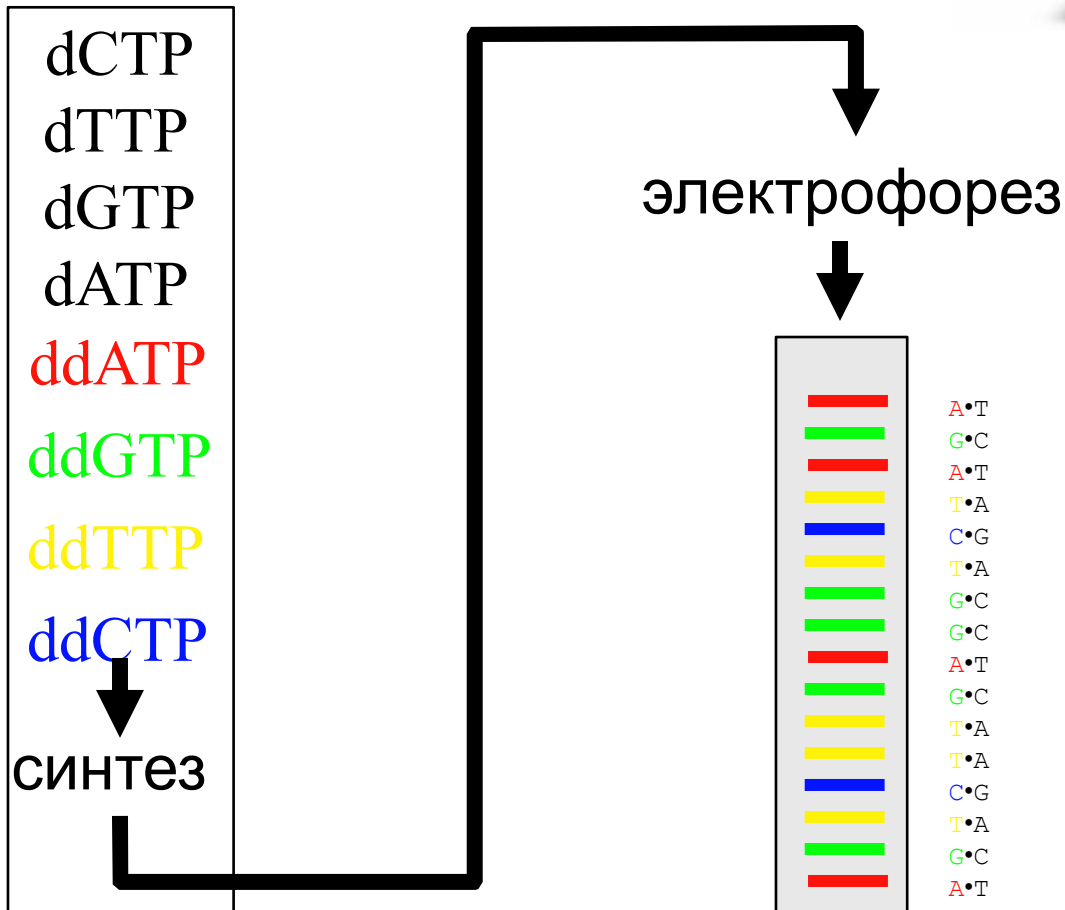


Overview of Sanger sequencing method



Автоматизация секвенирования по Сэнгеру

ДНК + полимераза +
праймер +



полимеразная
реакция с
одним
праймером

До 96 независимых
реакций, длина
чтения до 900 н.
Время одного
прогона ~ 40 минут

Сэнгер әдісінің кемшіліктері

- 500-750bp
- Қымбат
- Көп уақыт жұмсалады
- Адамның геномы 3 миллиард bp жуық

Maxam-Gilbert sequencing

- 1976-1977
- Walter Gilbert and Allan Maxam
- Developed a DNA sequencing method based on chemical modification of DNA at the time

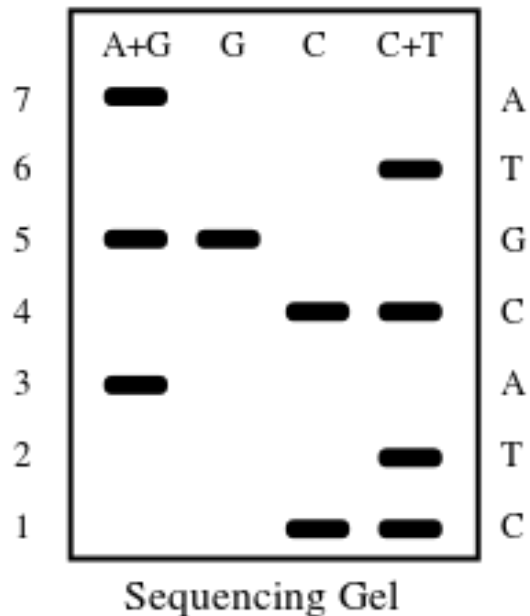
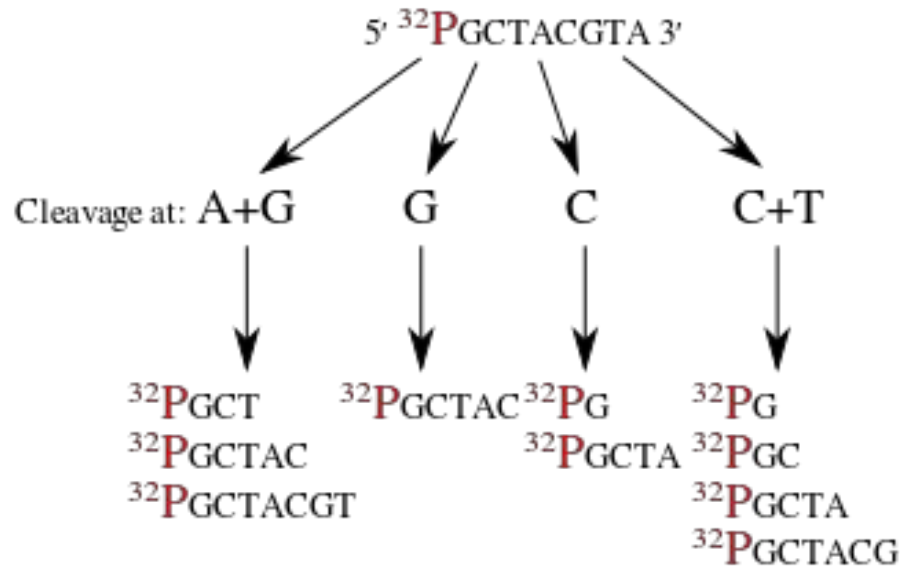


Walter Gilbert (1932 -)

Максам және Гильберттің химиялық әдісі

- Бұл әдіс 4 азоттық негіздер бойынша 5' ұшты радиоактивті белгісі бар ДНК-ның химиялық модификациясына негізделген. Арнайы төрт химиялық реакциялар арқылы азоттық негіздерді өзгеріске ұшыратып, **фосфодиэфирлік байланыстарды үзеді.**

Метод Максама-Гилберта



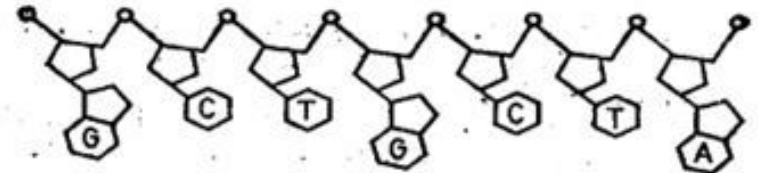
В основе метода секвенирования ДНК путем химической деградации лежит ограниченное расщепление меченого фрагмента ДНК под действием специфических реагентов. Непременным условием проведения секвенирования этим методом является наличие фрагмента ДНК, меченного только по одному концу. Определение нуклеотидной последовательности – методом ЭФ в ПААГ в последующей

Максам және Гильберттің химиялық әдісі

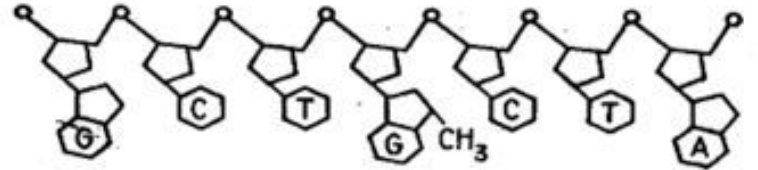
- ДНК-ның толық нуклеотидті реттілігін анықтау үшін көп мөлшерде бірдей ДНК-молекулалары қажет.
- Әр тізбектің 5' немесе 3' ұшына радиоактивті белгі енгізеді.
- ДНК-ны балкытып, біртізбекті ДНК бөлініп алынады.
- Әр пробиркаға 1 немесе 2 белгілі азоттық негіздерді арнайы бұзатын химиялық реагент қосылады.
- Нәтижесінде осы нуклеотид орналасқан жерде ДНК тізбегі бұзылады.

Основные принципы секвенирования по Максаму и Гилберту

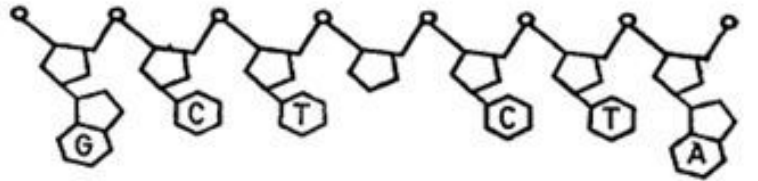
Фрагмент ДНК



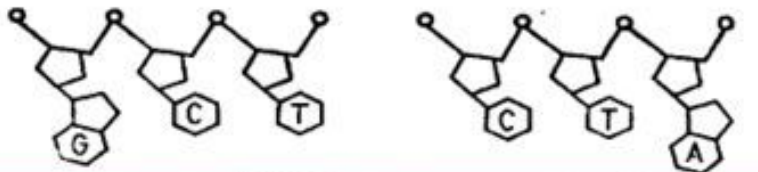
Модификация азотистого основания



Отщепление или замещение модифицированного основания



Разрыв сахаро-фосфатной цепи ДНК



Отщепление модифицированных звеньев от цепи ДНК после обработки вторичным амином или щелочью.

Таким образом, в результате химической деградации получается набор фрагментов ДНК различной длины. Длины этих фрагментов соответствуют положению мономерных звеньев того типа, который подвергся модификации. Концевая радиоактивная метка служит точкой отсчета при определении длины продуктов химической деградации ДНК.

Двухцепочечный фрагмент, подлежащий секвенированию, изолирован и радиоактивно помечен на 5'-концах ^{32}P .

2. Затем фрагмент разрезают ферментом рестрикции и таким образом метку удаляют с одного конца.

3. Фрагмент ДНК с одним меченым концом денатурируется.

4. Четыре идентичных образца этих концевых меченых фрагментов рестрикции ДНК подвергаются химическому расщеплению на различных химических нуклеотидах.

5. Существует четыре специфических набора химических реакций, которые избирательно разрезают костяк ДНК в G, A+G, C+T или C остатках.

- G only: Dimethyl sulphate(DMS) and piperidine
- A+G : DMS, piperidine
- C+T : Hydrazine, piperidine
- C only : Hydrazine, piperidine

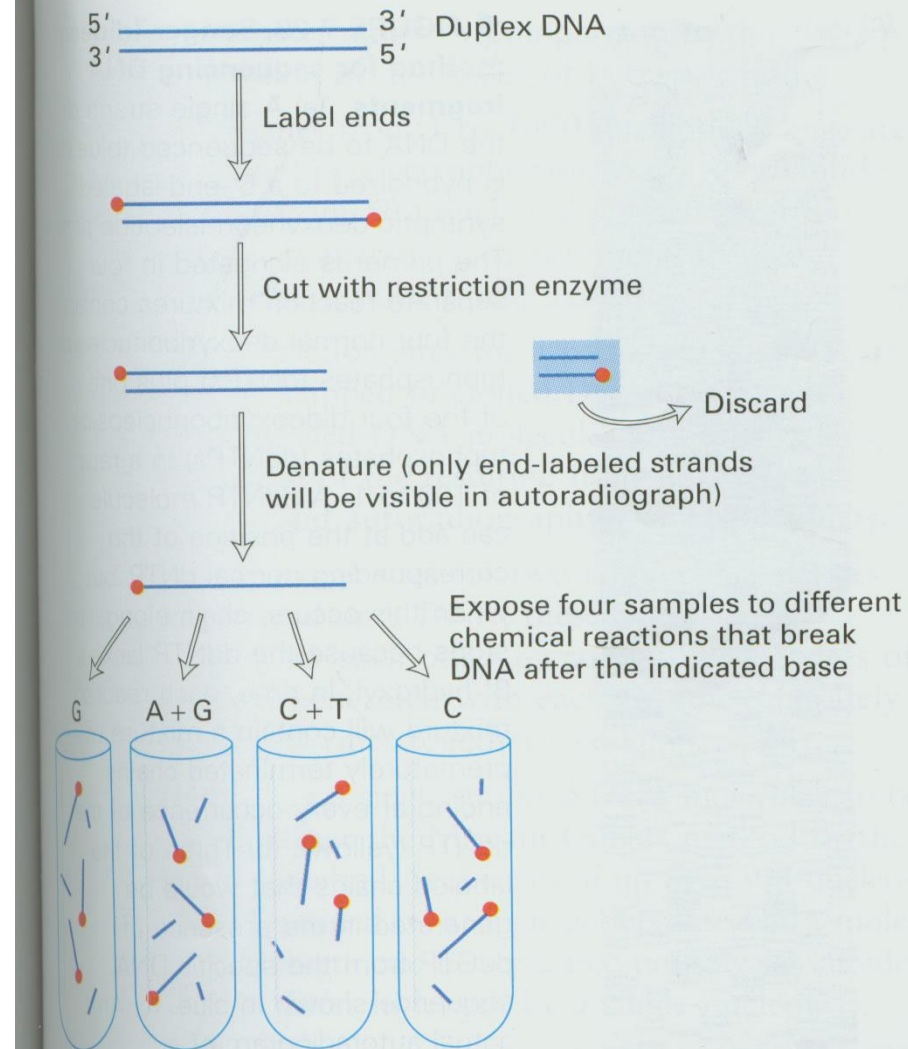
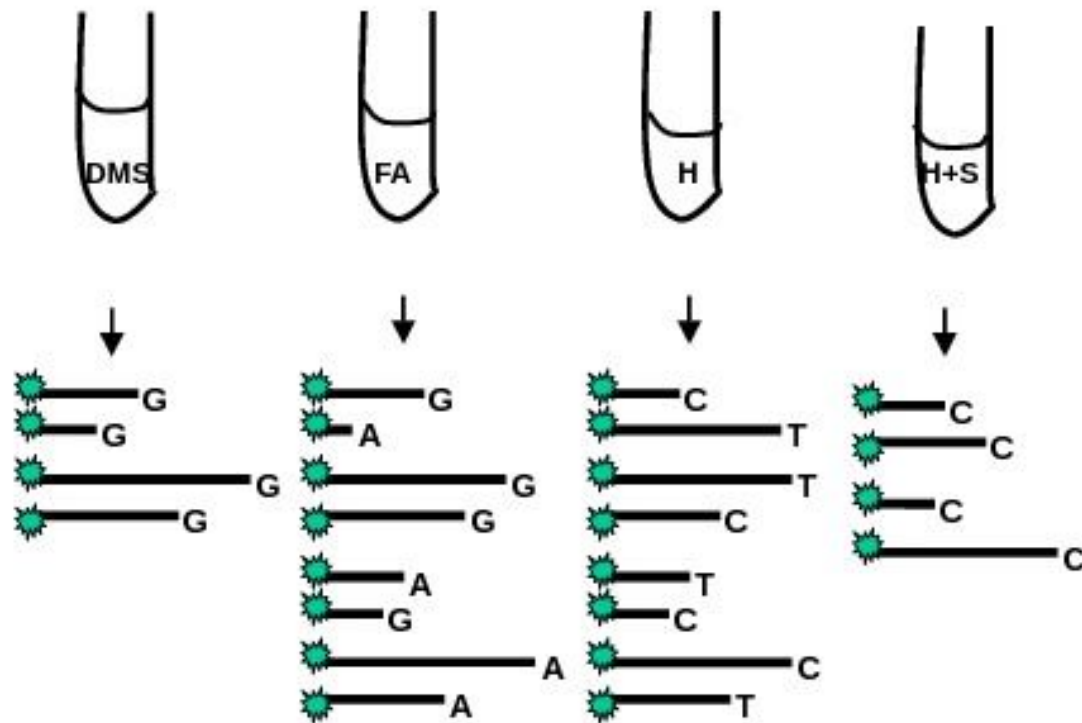


Figure: Maxam-Gilbert method
(continued)

Lodish, H.;Berk, A. *et. al.* (4th ed);
Mol. Cell Biol.; W. H. Freeman and Co. (2000)
p: 233

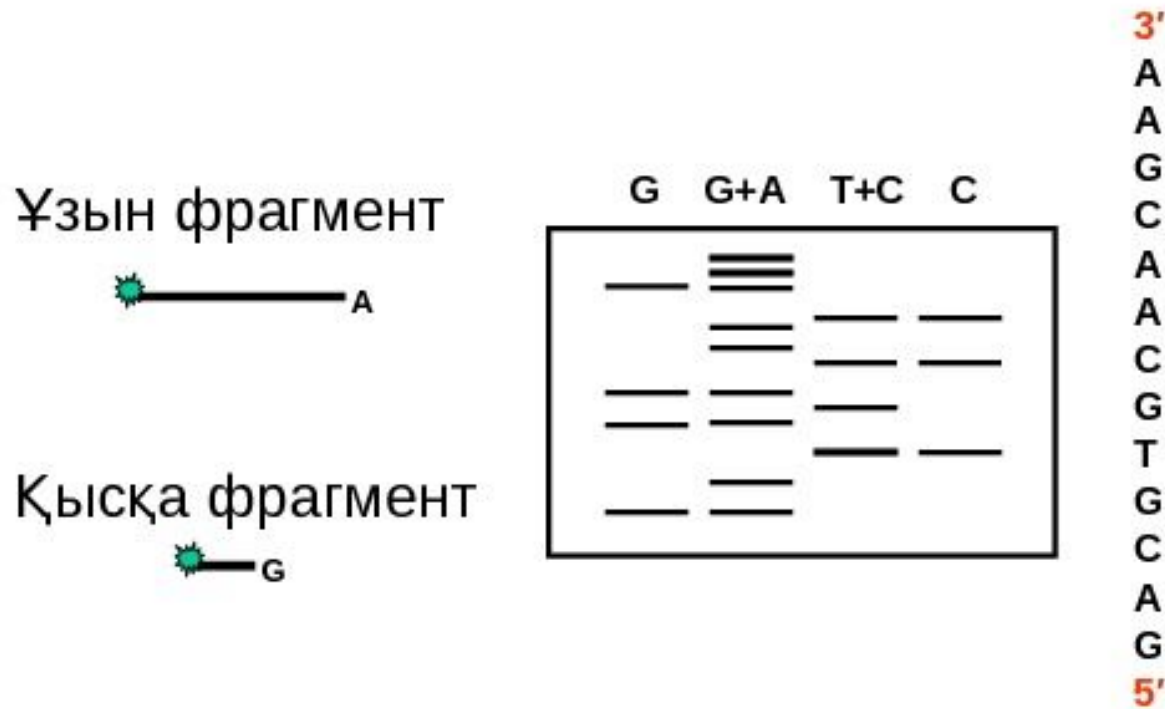
Table 10.1 Specific Base Reactions in Maxam-Gilbert Sequencing

Chain breaks at:	Base Modifier	Reaction	Time (min at 25°C)
G	Dimethylsulphate	Methylates G	4
G + A	Formic acid	Protonates purines	5
T + C	Hydrazine	Splits pyrimidine rings	8
C	Hydrazine + salt	Splits only C rings	8



Максам және Гильберттің секвенирлеу әдісінде қышқылды реагент орнын **құмырсқа қышқылын** пайдаланады. Мысалы, **пиперидин** дезоксирибозасының дегликлозилденген альдегид тобымен әркеттесіп, Шифф негізін түзеді де, **аденин** мен **гуанин** қалдықтары бойыша арнайы ыдырауы дүреду.

Максам және Гильберттің химиялық әдісі



Секвенстелген гельді астынан үстіге қарай оқиды (5'-тен 3').

9. The labeled fragments in the gel are visualized by autoradiography.
10. The sequence is read from bottom to top of the gel.

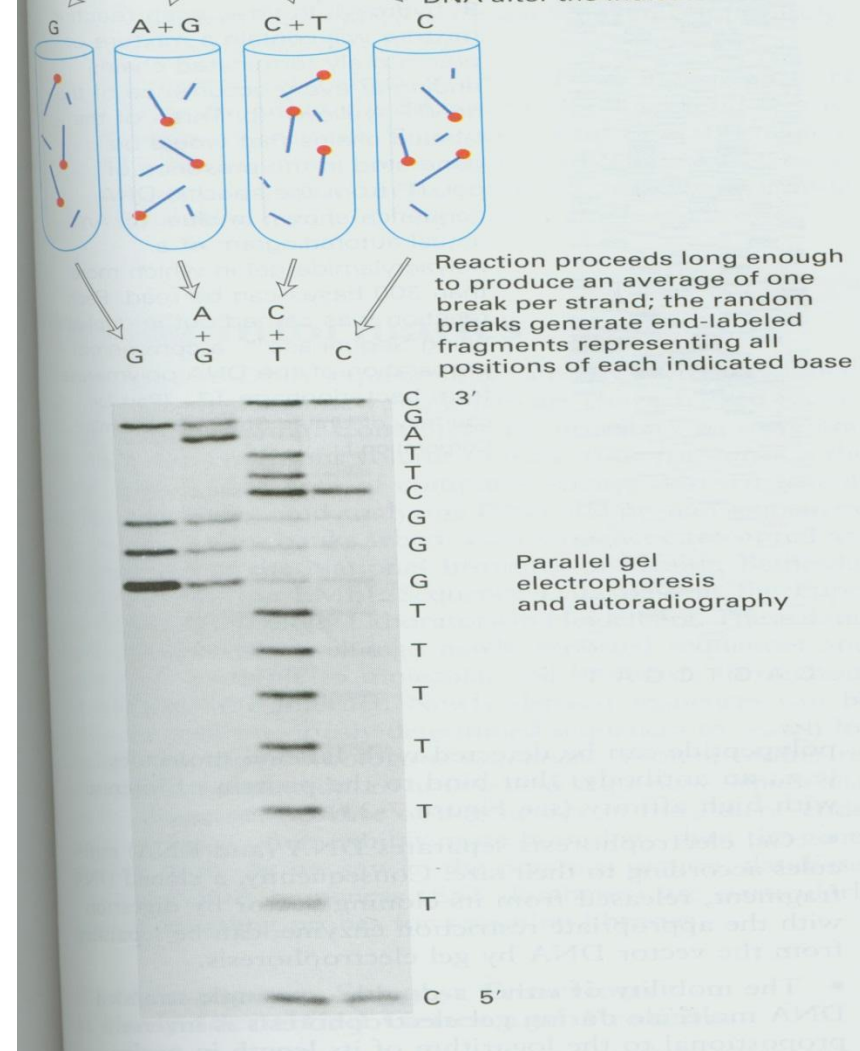
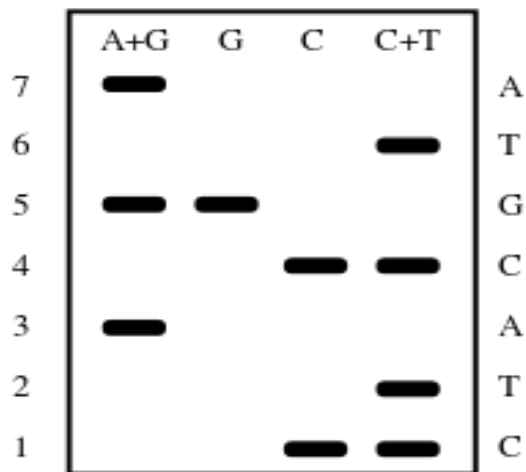


Figure: Maxam-Gilbert method

Lodish, H.;Berk, A. *et. al.* (4th ed);
Mol. Cell Biol.; W. H. Freeman and Co. (2000)
 p: 233



Химическая модификация азотистых основание заключается

В:

- Депуринизации (A+G) с использованием муравьиной кислоты
- Метилированию гуанина с использованием диметилсульфата
- Гидролизе пиримидинов (C+T) с использованием гидразина. При этом, добавление NaCl в реакцию с гидразином ингибирует гидролиз цитидина.

Модифицированные основания удаляются либо при повышении температуры, либо под действием кислоты или др. хим агентов (напр., пиперидин).

Образуются олигонуклеотиды, длины которых определяется

COMPARISON

<u>Sanger Method</u>	<u>Maxam Gilbert Method</u>
Enzymatic	Chemical
Requires DNA synthesis	Requires DNA
Termination of chain elongation	Breaks DNA at different nucleotides
Automation	Automation is not available
Single-stranded DNA.	Double-stranded or single-stranded DNA

(Next generation sequencing),
NGS

Высокопроизводительное секвенирование (Next-generation sequencing, NGS)

Появление коммерчески готовых технологий – начало 2000-х

В настоящее время производительность достигает **нескольких геномов** человека за один запуск одного прибора и постоянно увеличивается

4 ведущие технологии, конкурирующие между собой

NGS



454 Roche



Illumina/Solexa



PGM Ion Torrent



SOLiD Applied Biosystems

Общий принцип

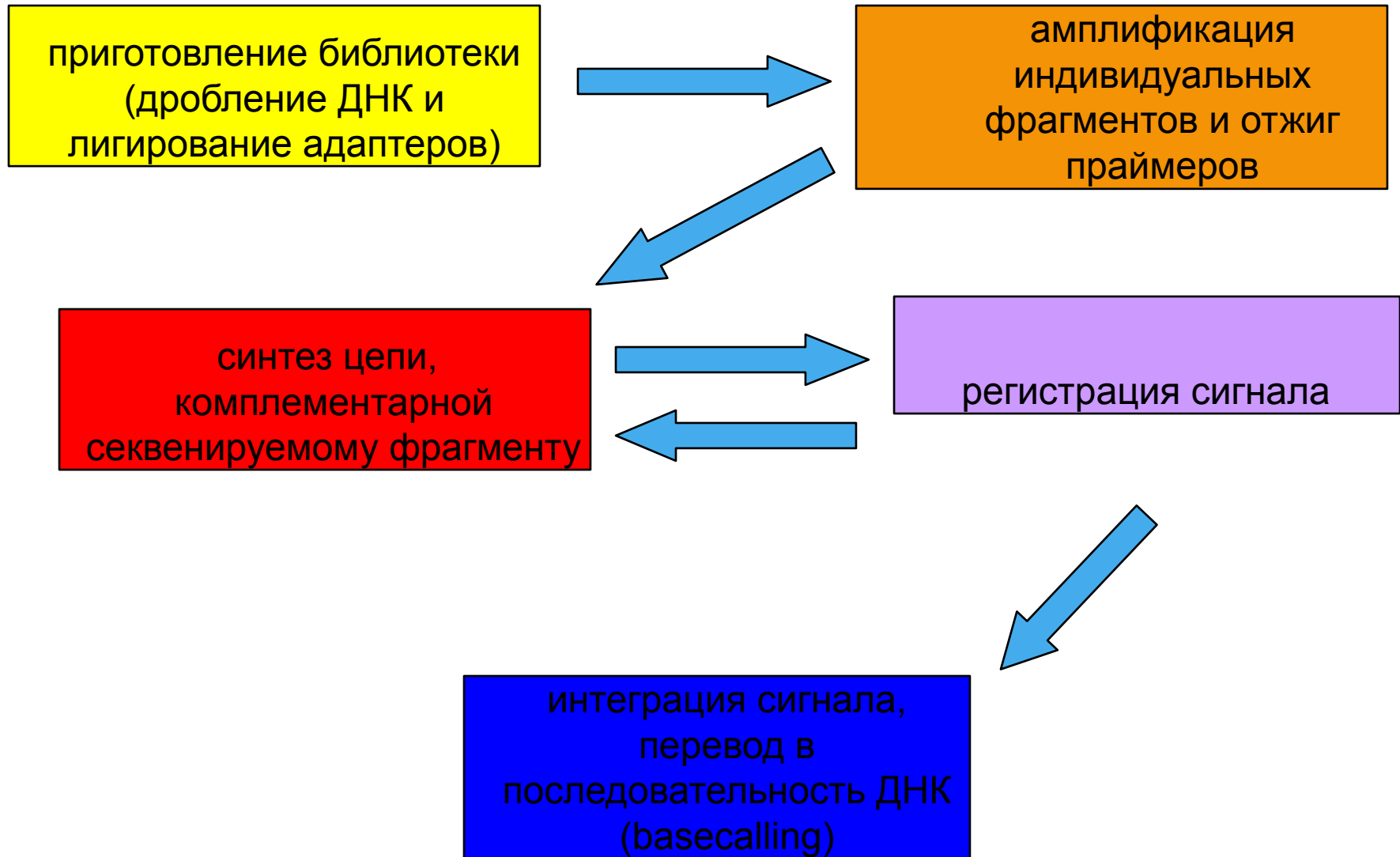
ДНК нарезается на фрагменты
определенной длины

К ним лигируются адаптеры

Аmplification каждого отдельного
фрагмента в изолированных от других
условиях

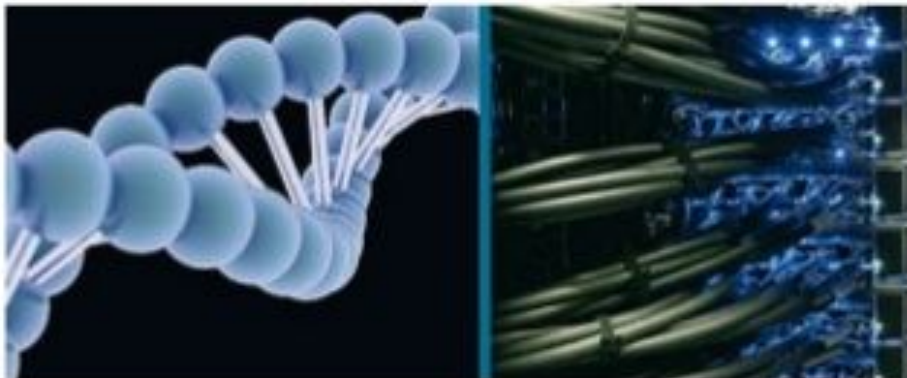
Анализ последовательности
амплифицированных клонов ДНК

Общая схема работы NGS: от исходной ДНК до «букв» на экране

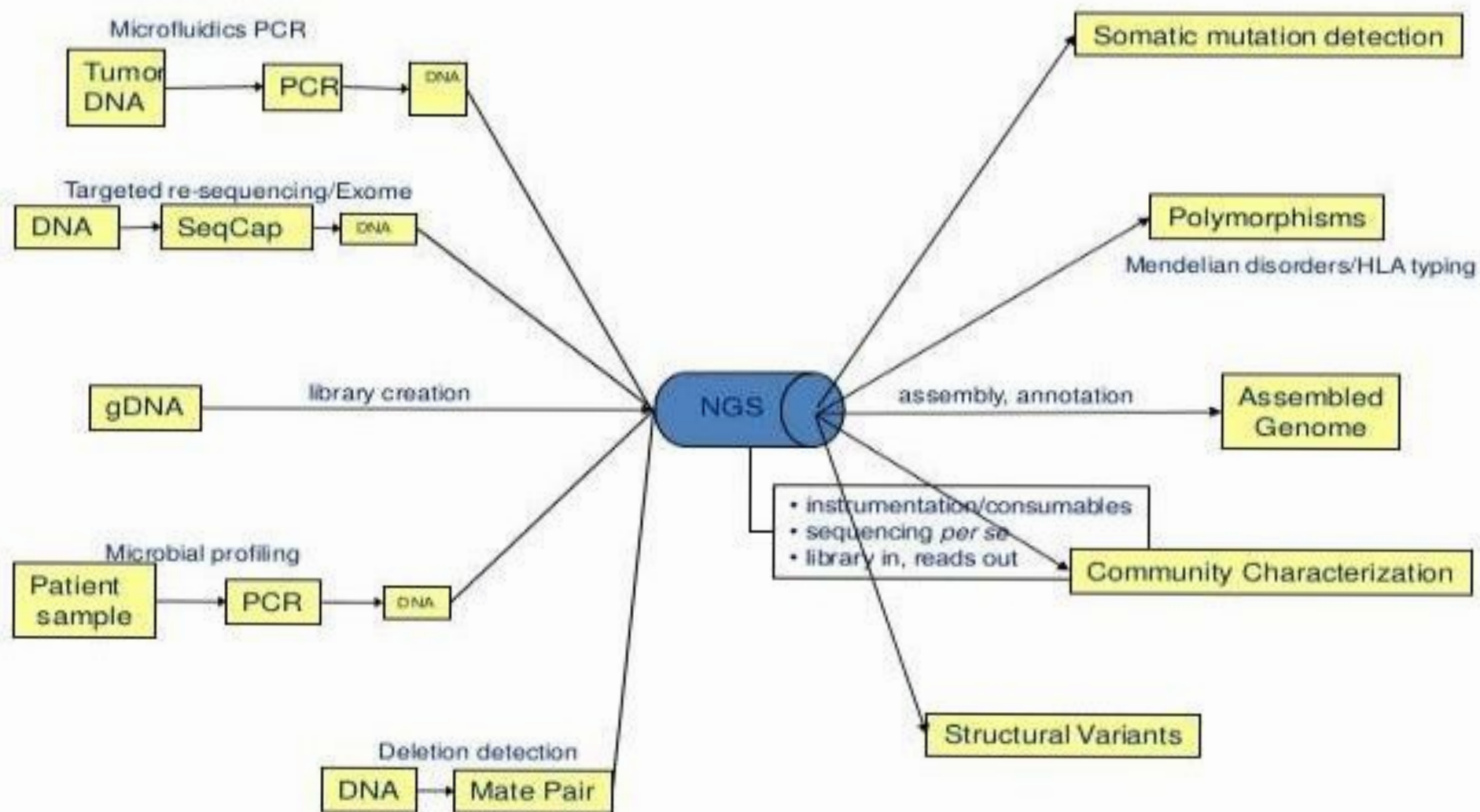


APPLICATIONS OF NGS

- Mutation discovery
- Transcriptome Analysis – RNA-Seq
- Sequencing clinical isolates in strain-to-reference mechanisms.
- Enabling Metagenomics
- Defining DNA-Protein interactions – ChIP-Seq
- Discovering non-coding RNAs
- Molecular diagnostics for Oncology & Inherited Disease study.
- Gene Regulation Analysis
- Whole Genome Sequencing
- Exploring Chromatin Packaging



FUTURE APPLICATIONS OF NGS

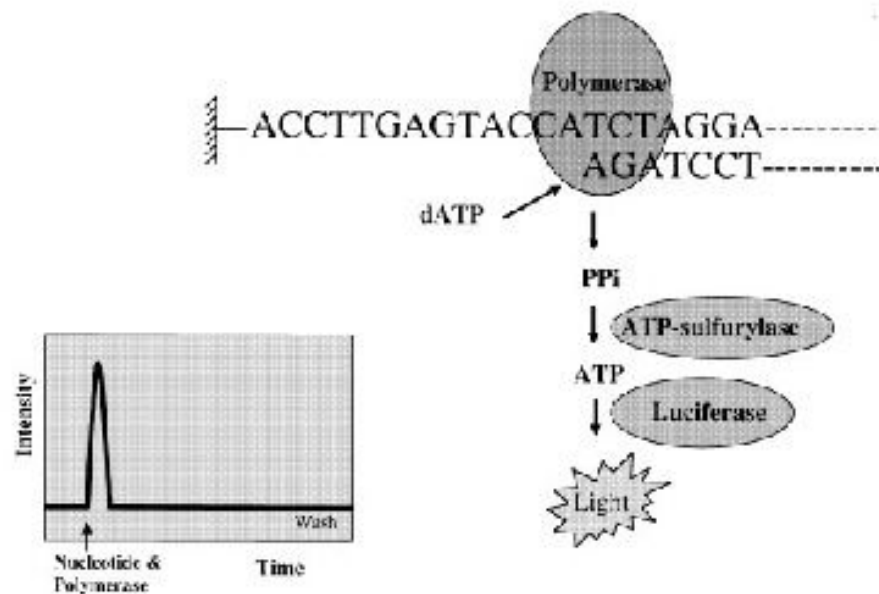


2^{ші} ұрпақты секвенирлеу әдісі: Пиросиквенирлеу әдісі

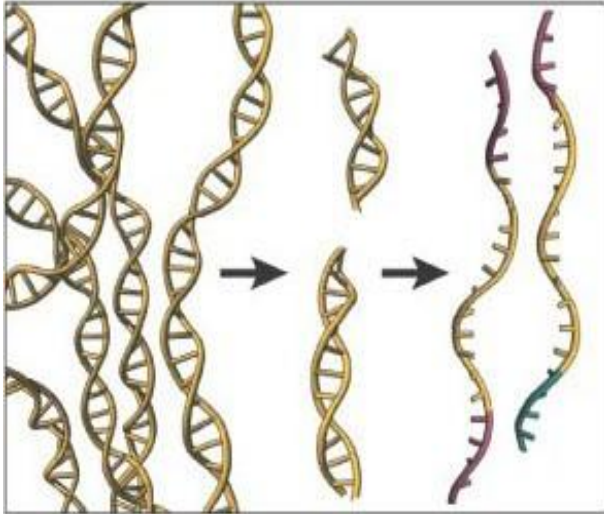
- Синтездік секвенирлеу
- Пайдалығы:
 - Дәл нәтижелі әдіс
 - Автоматандырылған
 - Танбаланған праймер мен нуклеотидтердің қажжетілігін жояды
 - Гель электрофорез қадамы керегі жоқ

Пиросиквенирлеу әдісі

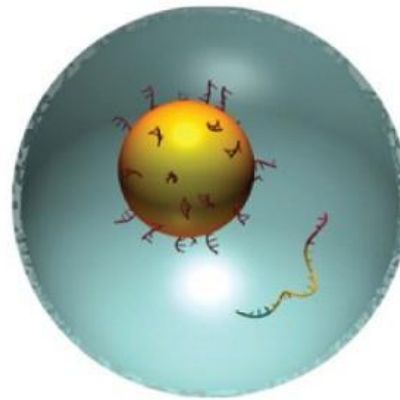
- 1ші әдісі
 - Қатты фазасы
 - Иммуобилизацияланған ДНК
 - 3 энзим
 - Жуып шығу қадамы, нуклеотид фрагменттерін бөліп шығару үшін



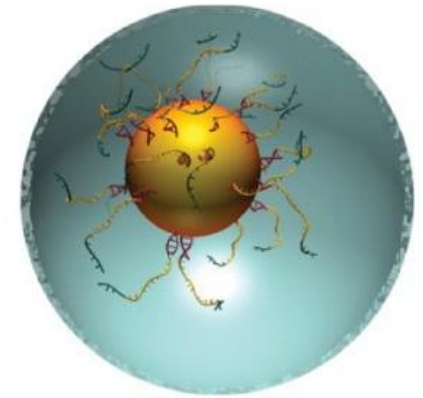
454 – принцип метода



ДНК фрагментируют и лигируют к фрагментам адаптеры

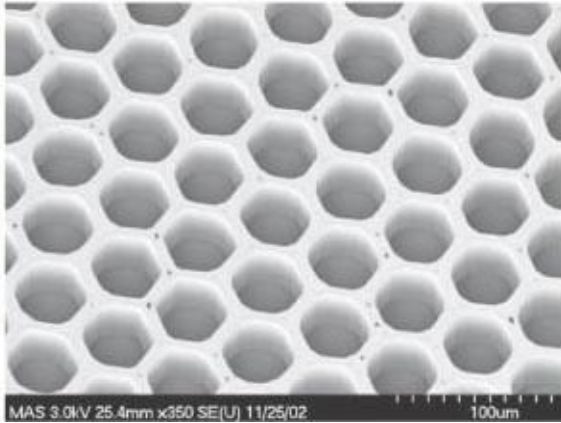


Фрагмент закрепляется на микро-шарике, покрытой олигонуклеотидами, комплементарными концам адаптера

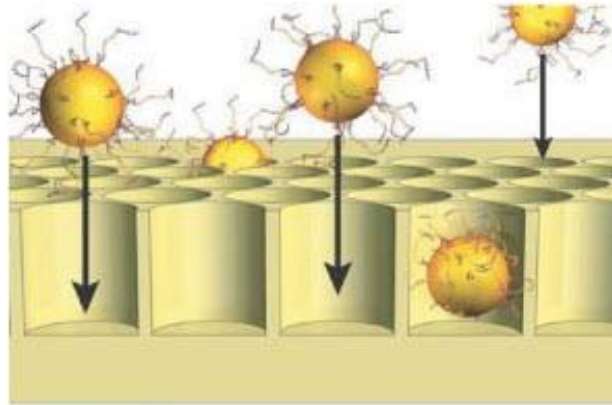


Шарики с ДНК смешивают с эмульсией, содержащей ДНК-полимеразу и dNTP и проводят ПЦР

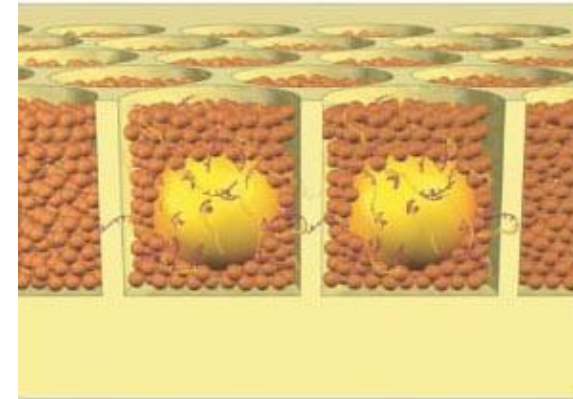
454 – принцип метода



Носитель – плашка с множеством (> 1 000 000) лунок

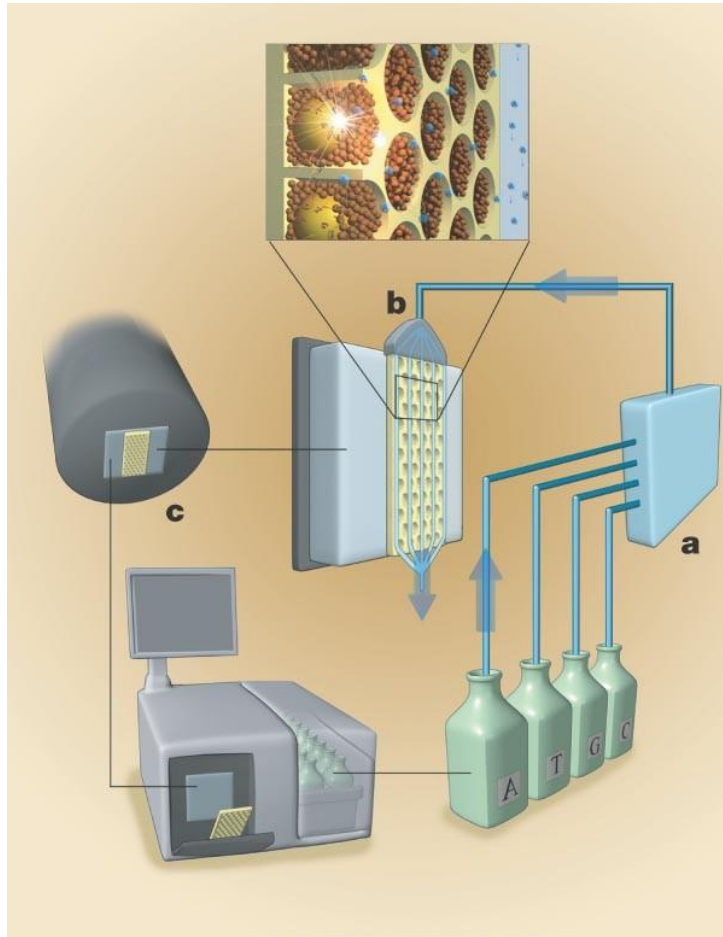


В лунки загружаются шарики, на которых закреплены фрагменты ДНК

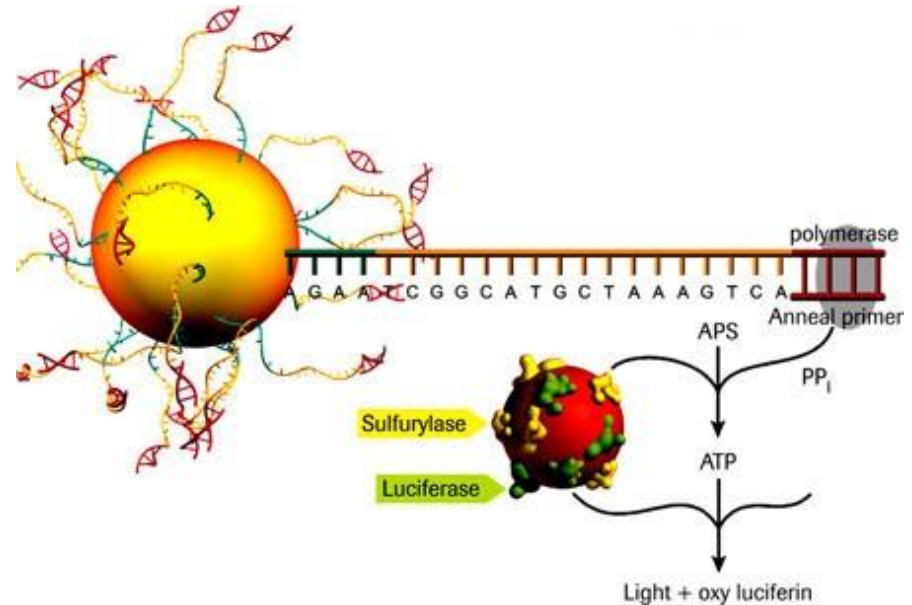


Также в лунки помещаются частицы с закрепленными на них ферментами – АТФ-сульфурилазой и люциферазой

454 – принцип метода



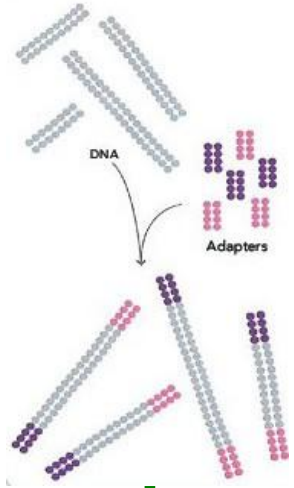
Через лунки заданном порядке
в реagenты (dNTP,
производит, аденозинфосфосульфат)



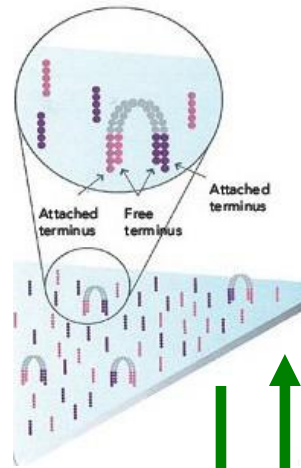
При присоединении dNTP выделяется пирозинфосфат. Сульфурилаза преобразует пирозинфосфат + аденозинфосфосульфат в АТФ. АТФ используется для окисления люциферина люциферазой. Световой сигнал регистрируется фотокамерой.

Секвенирование Illumina - принцип метода

1. ДНК фрагментируют и лигируют к фрагментам адаптеры

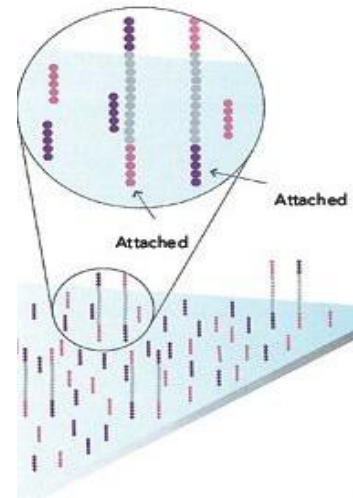
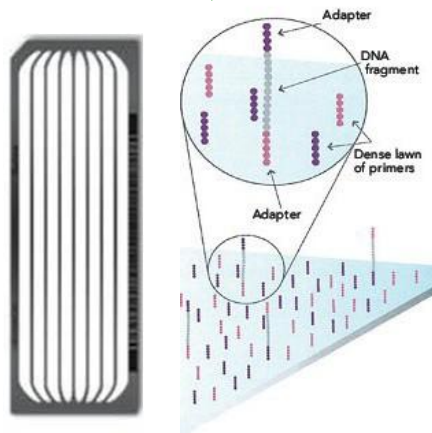
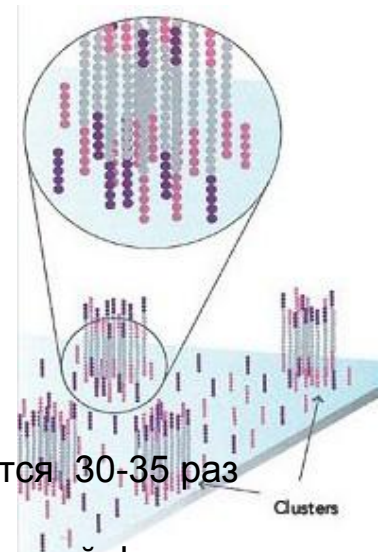


3. Через ячейку пропускают реагенты для достраивания второй цепи ДНК



Стадии 3-4 повторяются 30-35 раз

6. Каждый фрагмент оказывается окружен группой идентичных молекул («кластеры»).

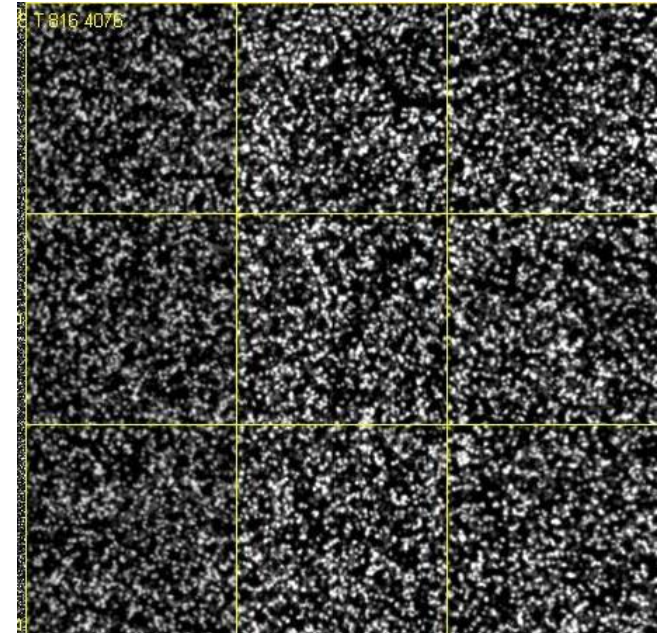
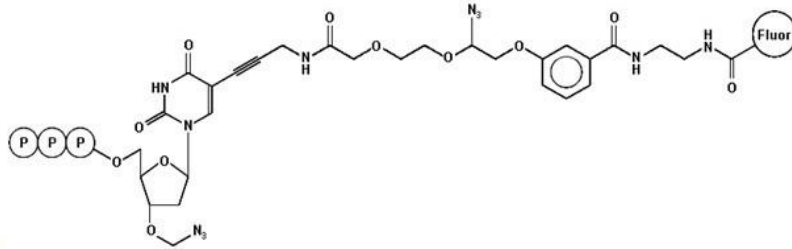
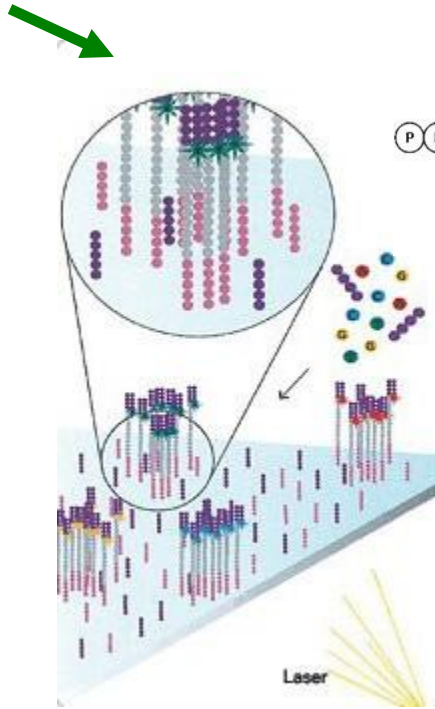


2. ДНК пропускают через каналы, покрытые элементарными концами адаптеров,

4. Денатурируют фрагменты

фрагменты

Секвенирование Illumina - принцип метода



7. Через ячейку пропускают реагенты (флуоресцентно меченые терминированные dNTP и полимеразу)

10. Повторение 7-9
нужное число раз (50-
300). Число циклов
соответствует длине
чтения.

8. На ячейку светят лазером
и проводят съемку.

9. Через ячейку пропускают
реагенты, отщепляющие
флуорофор и терминатор

Illumina – преимущества и недостатки

• Преимущества:

- высокая точность
- универсальность
- доступность ПО для обработки и анализа результатов
- наименьшая цена получаемых данных (в расчете на нуклеотид)

Недостатки

- высокая цена реагентов
- проблемы с секвенированием матриц с низкой сложностью
- большая длительность прогона
- ошибки в GC-богатых участках

Секвенирование путем лигирования (SOLiD)

платформа	Solid 5500
длина чтения	75+35, 60+60
число чтений, М	>1 400
объем данных	150 Гб
цена за запуск/цена за Мб (в \$)	10 503/0.07
время работы	8 дней

Преимущества:

- высокая точность
- возможность использовать часть дорожек на ячейке

Недостатки

- очень короткие чтения
- длительность работы
- относительно малая доступность свободного ПО

Циклическое лигазное секвенирование.

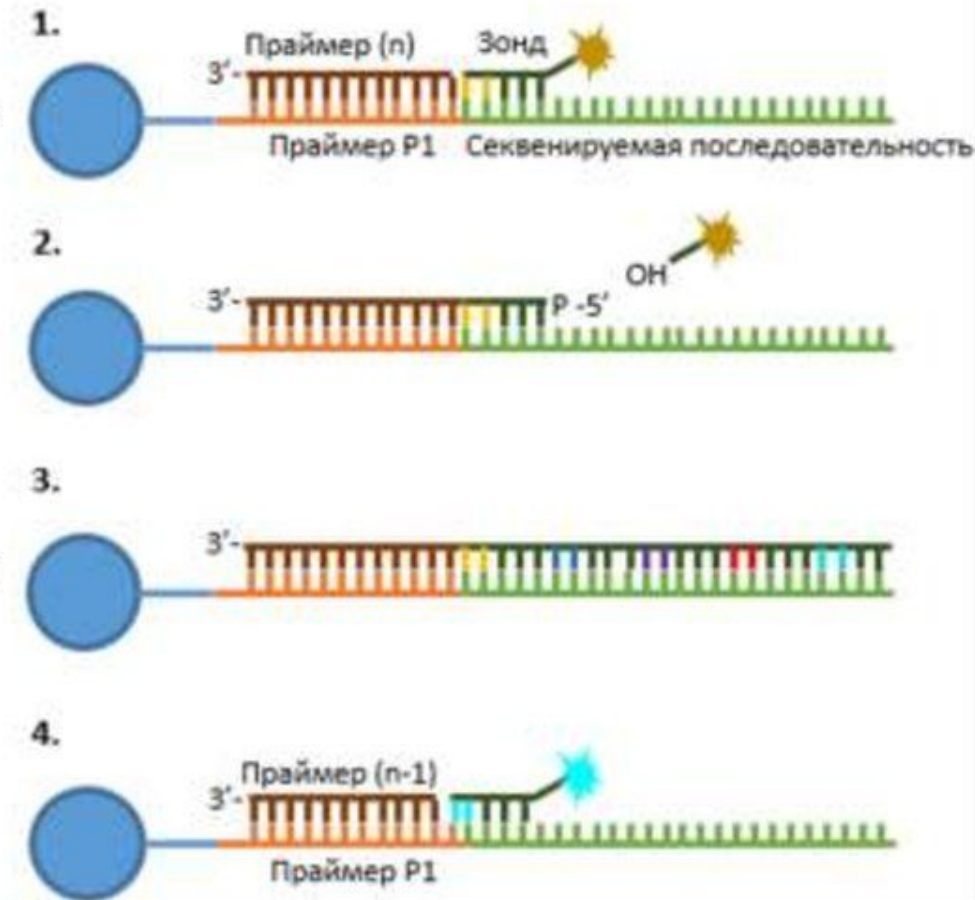
SOLiD

(1) Начало 1 раунда: добавление праймера длины n и 8ми нуклеотидного зонда, лигирование их друг с другом, детекция флуоресценции.

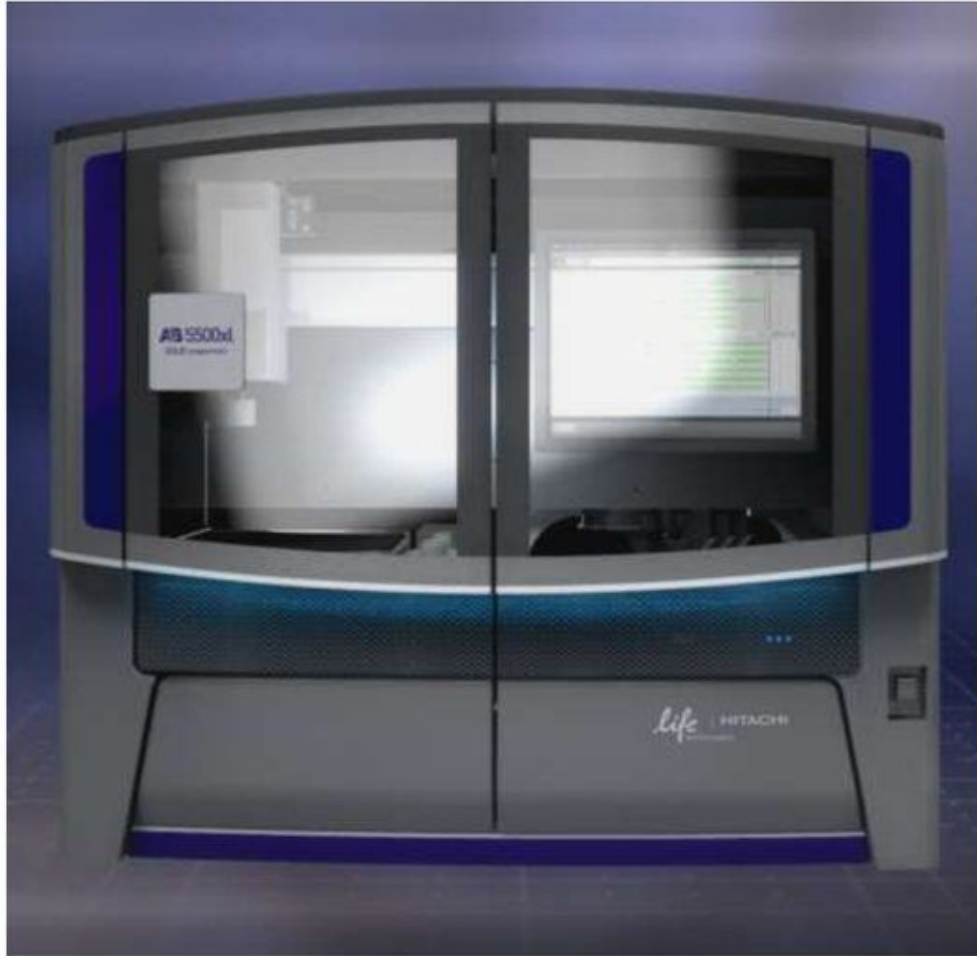
(2) Разрезание зонда, освобождение от метки.

(3) 5 последовательных циклов 1 раунда (повтор стадий (1) и (2)).

(4) Начало 2 раунда: добавление праймера длины $n-1$ и 8ми нуклеотидного зонда, лигирование их друг с другом, детекция флуоресценции.



Циклическое лигазное секвенирование.



Длина единичного фрагмента ДНК, секвенируемого методом лигирования, достигает 75 п.н. с точностью до 99,99 %. Выпущенный компанией «Applied Biosystems» прибор «5500xl SOLiD System» способен за один цикл секвенировать 3 полных генома человека с 30-кратным покрытием и точностью 99,9999 %

Полупроводниковое секвенирование

Самая новая из технологий секвенирования 2 поколения

Сходно с 454-секвенированием, но регистрируется не свет, а pH

платформа	Ion Torrent	Ion Proton
длина чтения	до 400	200
число чтений, М	4-5.5	60-80
объем данных	2 Гб	12-16 Гб
цена за запуск/цена за Мб (в \$)	939/0.60	1 000/0.02
время работы	7 часов при длине 400	4 часа

Преимущества:

- относительно низкая цена за запуск
- быстрота

Недостатки

невысокая точность прочтения гомополимерных участков
низкая производительность

Бисульфитті секвенирлеу

- Бисульфитті секвенирлеу - бисульфитпен өңдеу арқылы ДНҚ метилдеу паттернасын зерттеуге бағытталған әдістер тобының жалпы атауы.

- Бисульфит цитозинді урацилға айналдыра отырып, бір тізбекті ДНҚ-ға әсер етеді. Егер осы цитозин метилденген болса, яғни оның бесінші Атом көміртегіне метильді топ қосылған болса, онда мұндай цитозин айналуға ұшырамайды.
- Осылайша, бисульфит ДНҚ реттілігін оның метилдеу паттерніне байланысты өзгертеді және оның әсерінен кейін CpG-динуклеотидтердің метилденген екенін анықтауға болады.

Бисульфитная модификация ДНК

ACTTCGTAAGGGGCCT^{CH₃}CGTA



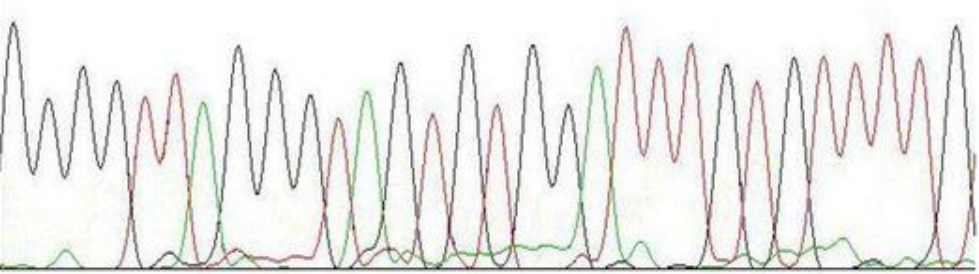
NaHSO₃

AUTTUGTAAGGGUUT^{CH₃}CGTA

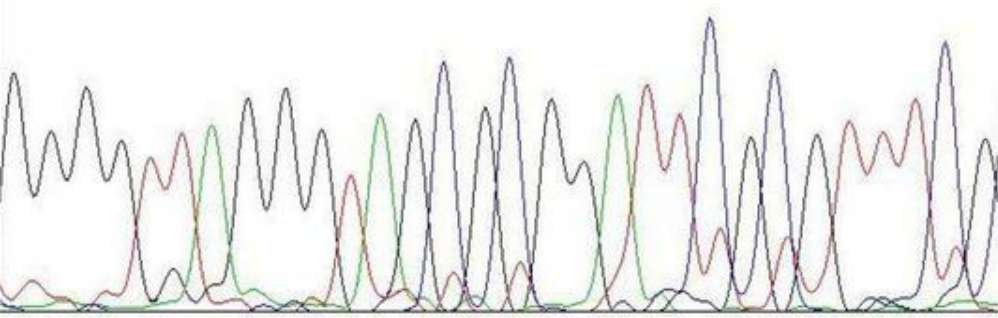
- Бисульфитті секвенирлеудің бірінші әдісі 1992 жылы сипатталған. Метилдеу паттернін анықтау үшін ПЦР қолданылды, ол үшін праймерлер өзгертілген және өзгермеген бисульфит ДНҚ-ға тән болды, яғни олар CpG-динуклеотидтерге кіретін цитозиндер жоқ. Праймерлер үшін метилдеу сайтына жақын, бірақ оны қамтымайтын учаскелер пайдаланылды.
- Цитозин метилденбеген жағдайда амплифицирленген ретпен тимин (урацил), ал синтезделген комплементарлық ретпен аденин табылды. Егер цитозин метилденсе, онда амплифицирленген тізбекте ол қалды, ал комплементарлы синтезде гуанин қалды. Мұндай әдіс өте қиын, өйткені ПТР өнімдерін қажетті сезімталдыққа жету үшін клондауды талап етеді. Осы мәселені салынған ПТР көмегімен шешуге болады.

Бисульфитное секвенирование

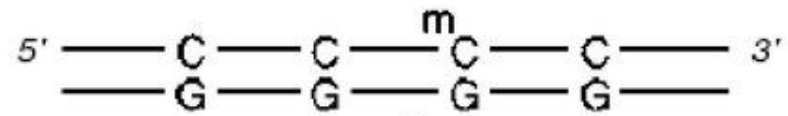
110 120 130
 G G G G T T A G G G T A G T G T G G A T T T G T G T T T T G



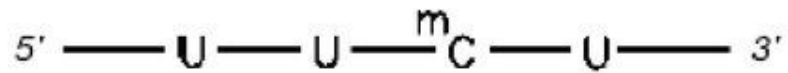
110 120 130
 G G G G T T A G G G T A G C G C G C G G A T T C G C G T T T C G



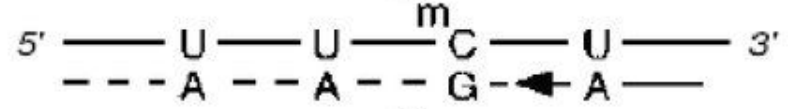
геномная ДНК



обработка бисульфитом натрия



ПЦР - первый цикл



ПЦР

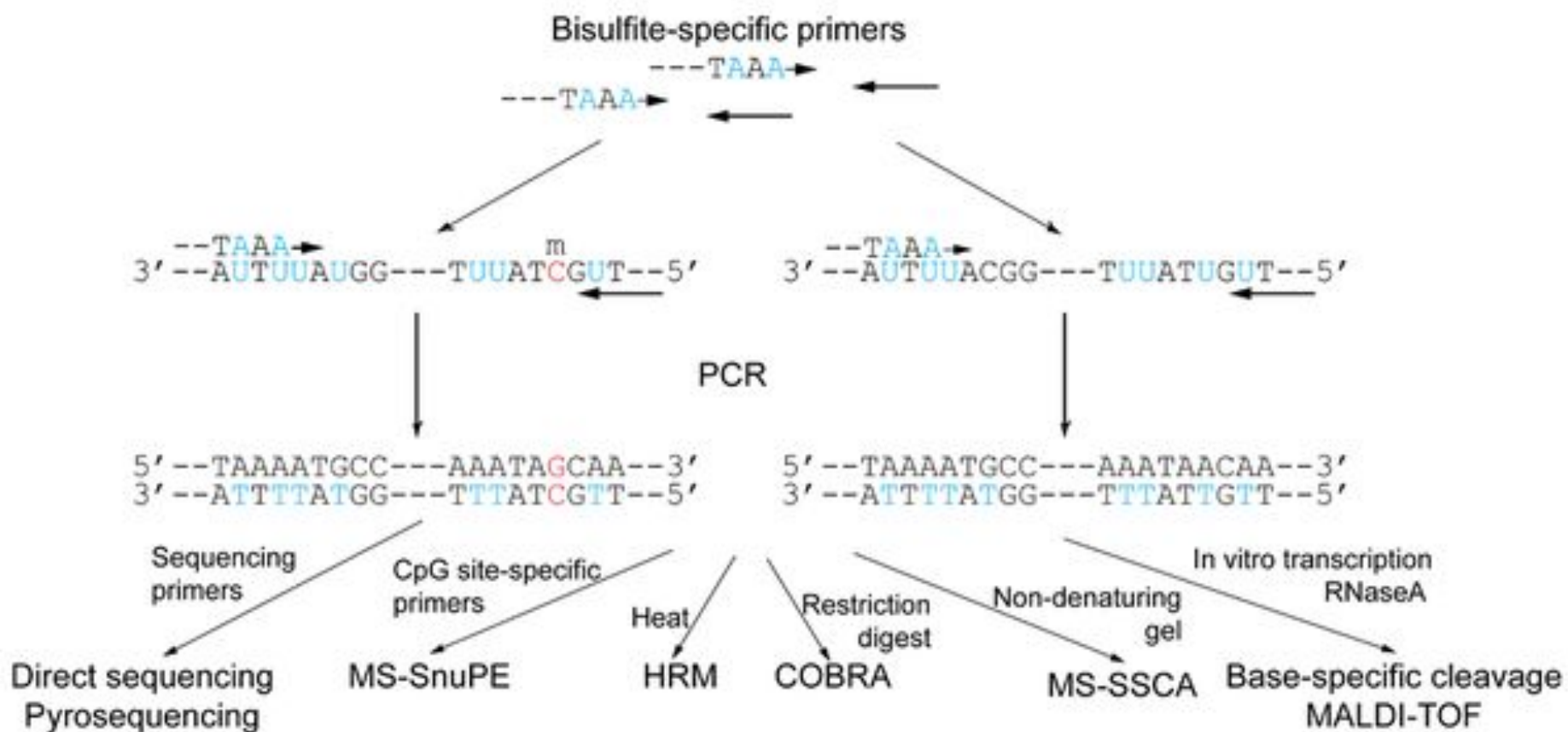


секвенирование ПЦР-продукта

после бисульфита

без обработки



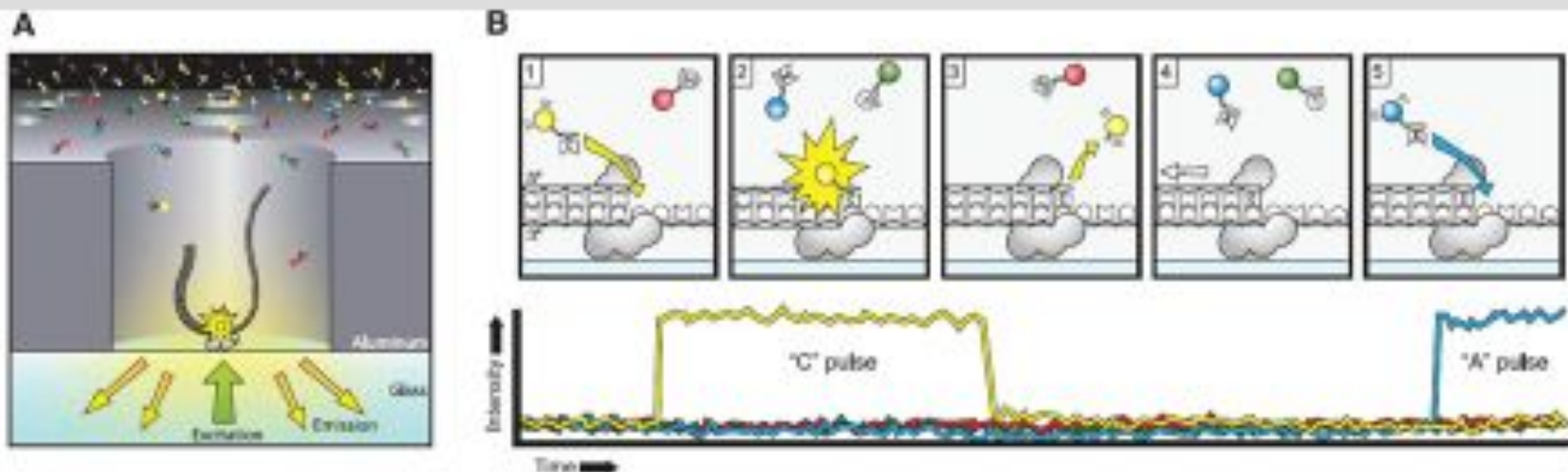


- Бисульфитті секвенирлеу әдістері бірқатар шектеулерге ие. Сүтқоректілерде ДНҚ 5-гидроксиметилцитозин модификациясы кең таралған. Бисульфитпен өңдеу кезінде 5-гидроксиметилцитозин цитозин-5-метилсульфонатқа айналады, ол секвенирлеу кезінде ц деп танылады. Осылайша, бисульфитті секвенирлеу 5-гидроксиметилцитозин мен метилцитозинді ажырата алмайды, сондықтан ДНҚ метилденуіне ғана сезімтал әдіс ретінде қарастырыла алмайды.

Секвенирование единичных молекул.

Pacific Biosciences (SMRT sequencing)

Используется полимеразы, иммобилизованная в 100-нм лунках, и флуоресцентно меченые dNTP. Возможны очень длинные чтения (> 10 000), но высокая частота ошибок (до 10%). Возможно прямое секвенирование метилированной ДНК, ведется работа над разработкой прямого секвенирования РНК.

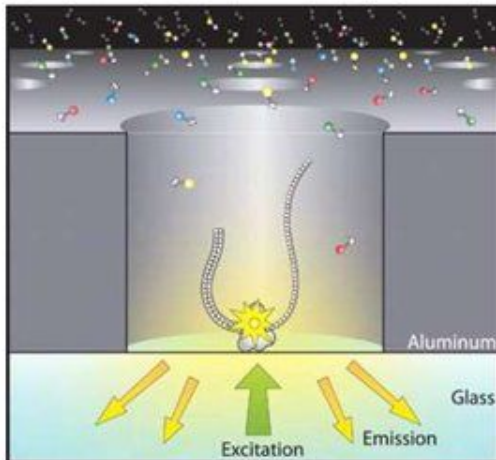


Области применения – де ново сборка (в сочетании с Illumina для коррекции ошибок), анализ изоформ, поиск модифицированных оснований

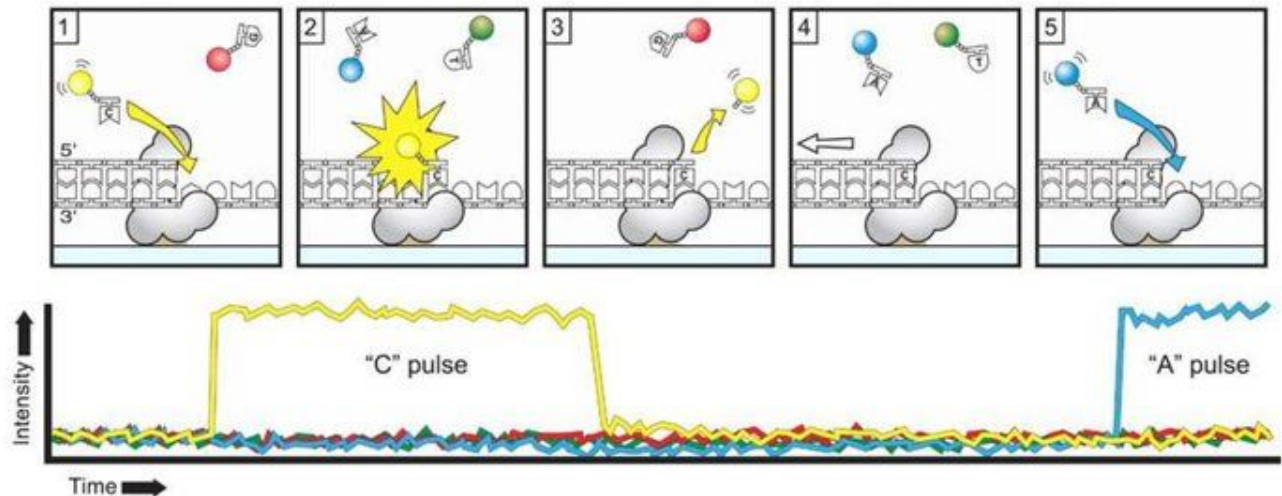
Секвенирование единичных молекул в реальном времени.

Секвенирование в реальном времени однонитевых фрагментов ДНК длиной до 10000 п.н. и более с помощью ДНК-полимеразы. На дно специальных ячеек, расположенных на прозрачном стекле, прикрепляются одиночные молекулы ДНК-полимеразы. Область вокруг закрепленного фермента просвечивается с помощью специального лазера. В каждую ячейку добавляют нуклеотиды всех четырех типов, помеченные разными светящимися маркерами. Область, которую анализирует лазер, столь мала, что меченые нуклеотиды не задерживаются в ней достаточно долго, чтобы их свечение было зафиксировано прибором. Если же ДНК-фрагмент удерживается полимеразой, то во время достройки его комплементарной цепи сигнал от каждого присоединившегося нуклеотида фиксируется в сканируемой области. После присоединения очередного нуклеотида его светящаяся метка удаляется

A

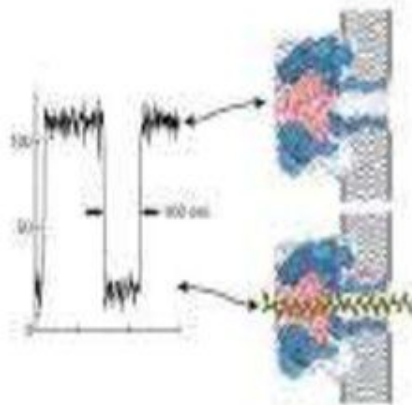


B



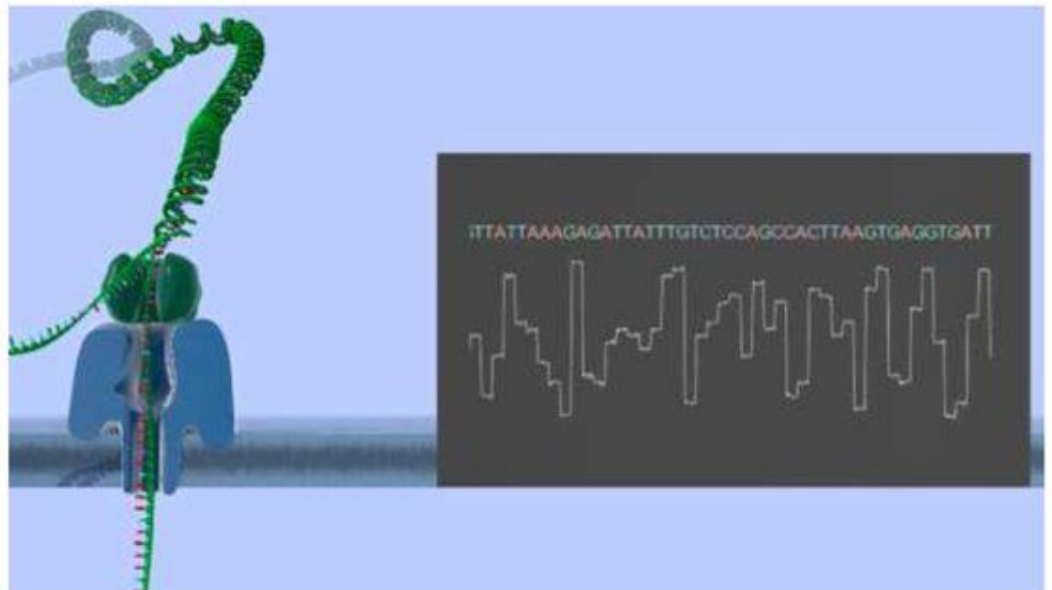
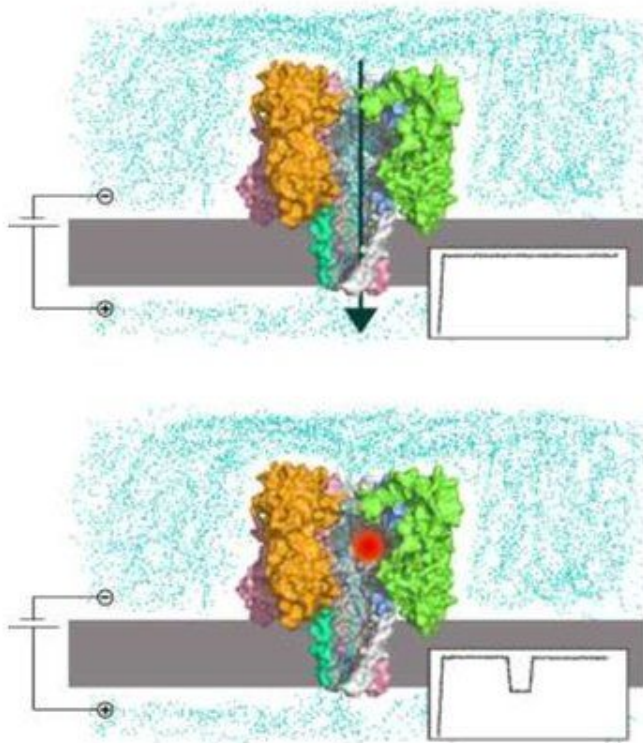
Нанопоровое секвенирование

Методы нанопорового секвенирования



Метод основан на измерении тока ионов через единичную нанопору в непроводящей мембране. При прохождении через эту пору нуклеотидов ток падает. Время, на которое изменяется ток ионов, и величина этого падения зависят от того, какой нуклеотид в данный момент находится внутри поры.

Нанопоровое секвенирование



- Возможно только для одноцепочечных молекул.
- В отсутствие молекулы ток ионов через нанопору максимальный.
- Молекула нуклеиновой кислоты под действием поля протаскивается через пору и частично снижает проходимость ионов.
- Снижение тока зависит от размера фрагмента молекулы.