FLUIDIGM

iontorrent
by Thermo Fisher Scientific

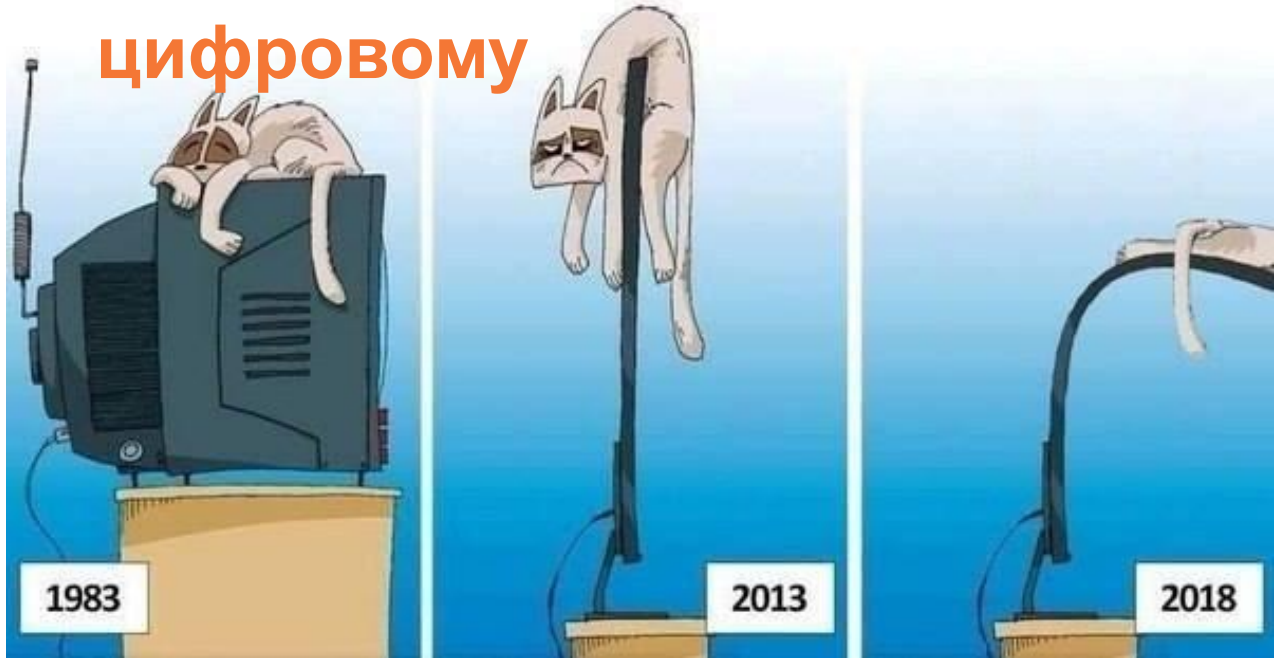
Биология в формате ULTRA HD

helicon

Artem Bogomolov a.bogomolov@helicon.ru

Эволюция

От аналогового к цифровому



Разрешение

HD >>> Full HD >>> Ultra HD

Секвенирование

От отдельных последовательностей до полных геномов всего за 30 лет!

Capillary Electrophoresis

- ✔ “Gold Standard”
- ✔ 1000 b.p. per run
- ✔ 3 days run

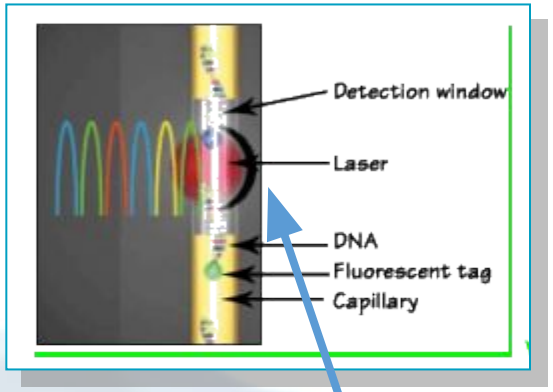
Next Generation Sequencing

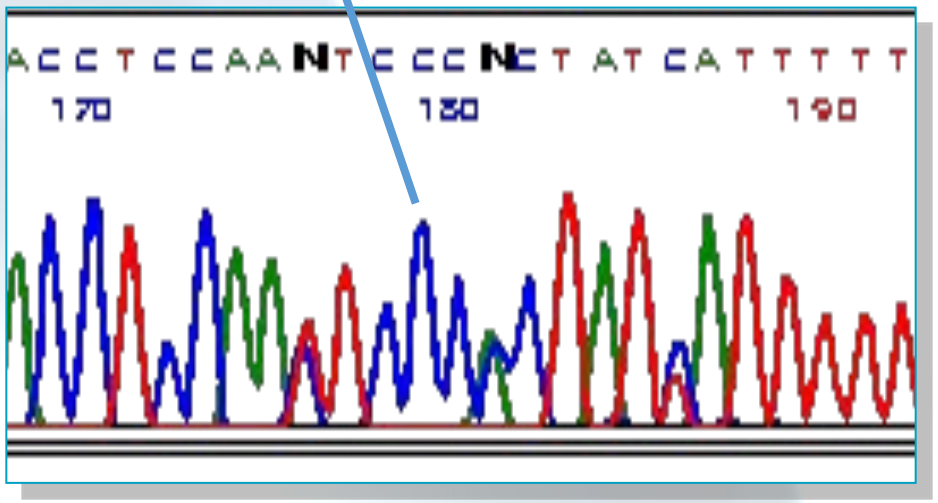
- ✔ Revolution in molecular genetics
- ✔ 100 000 000 b.p. per run
- ✔ Less then 24 hours for run

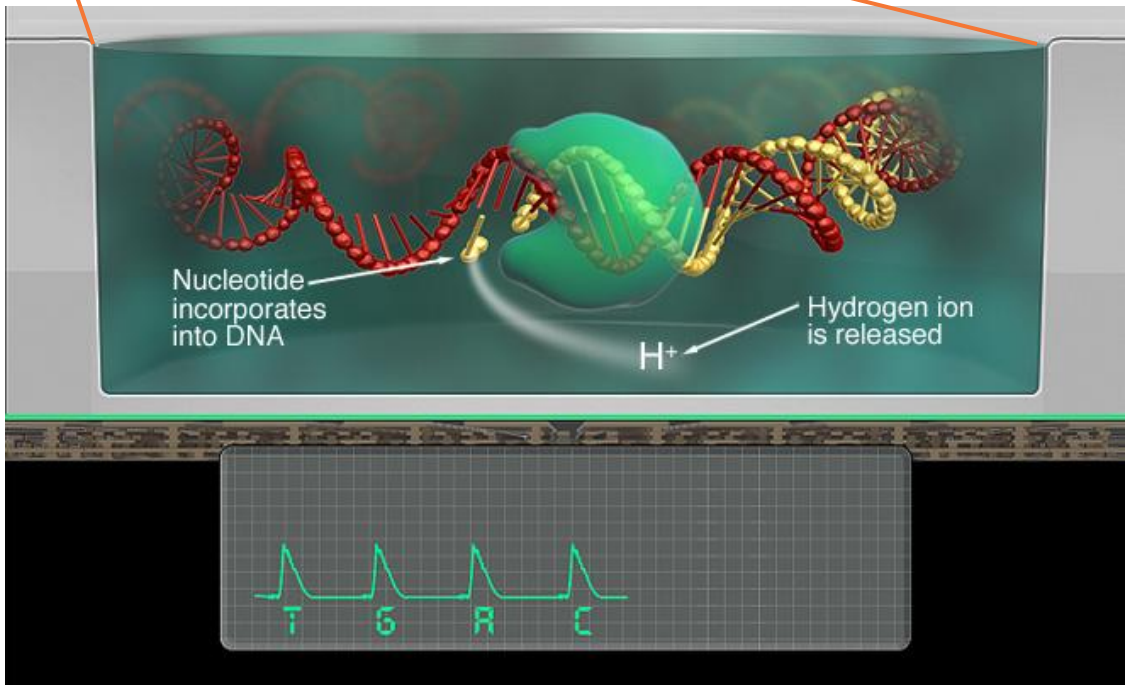
*https://en.wikipedia.org/wiki/DNA_sequencing

helicon

Цифровая революция

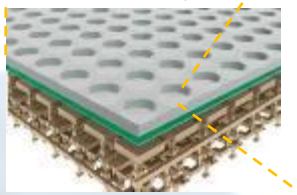


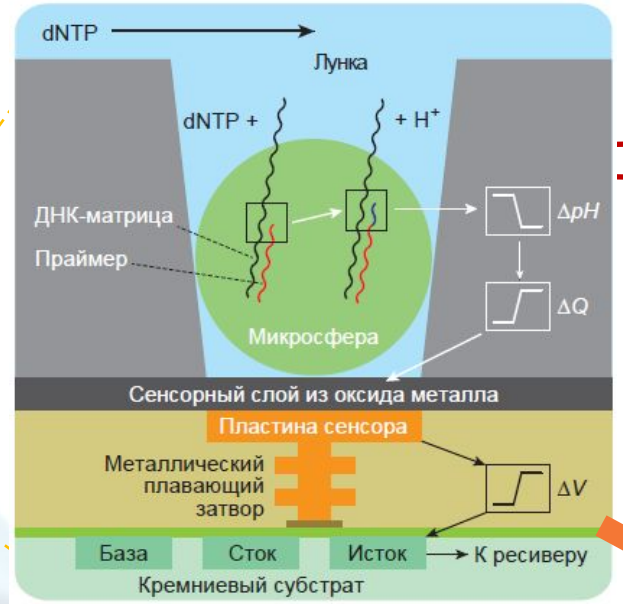


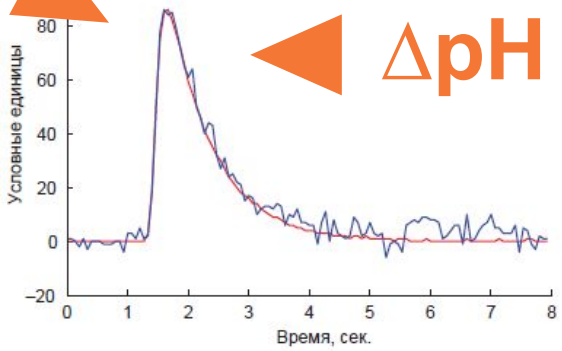


Ion Torrent

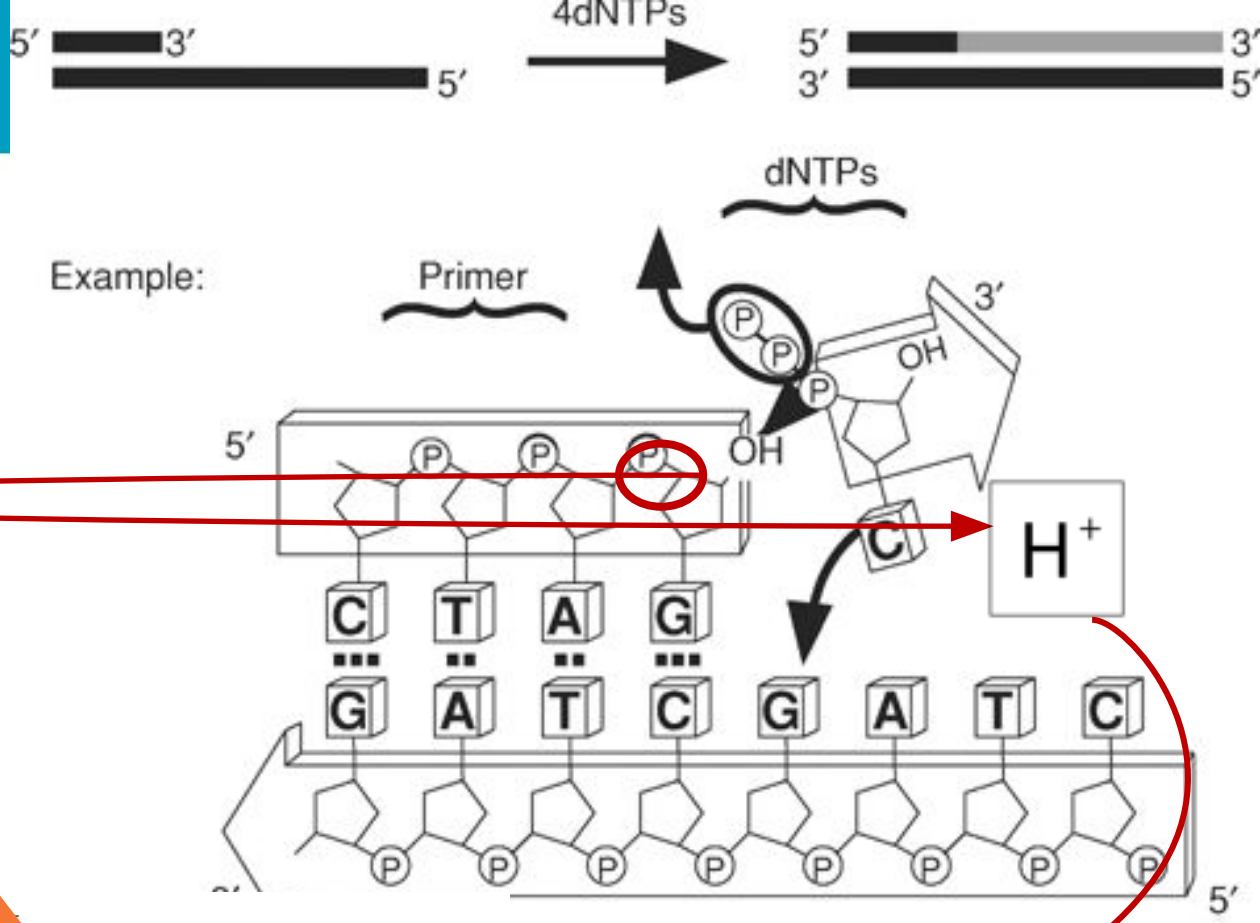
Полупроводниковый чип







ΔpH



Rothberg J.M. *et al Nature doi:10.1038/nature10242*

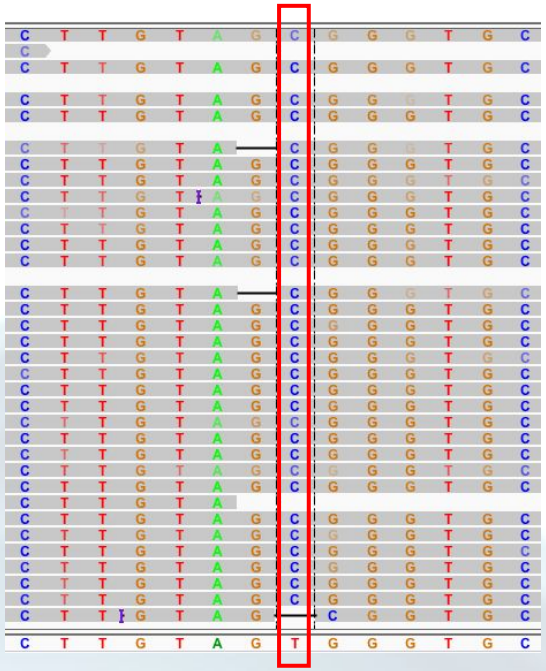
helicon

К вопросу о разрешении…

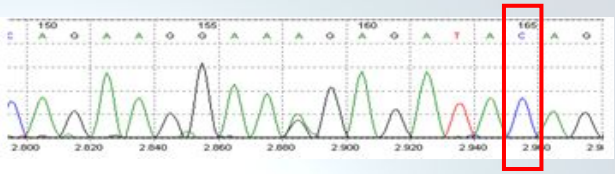
Порог детекции CE - 20%

Порог детекции NGS<1%

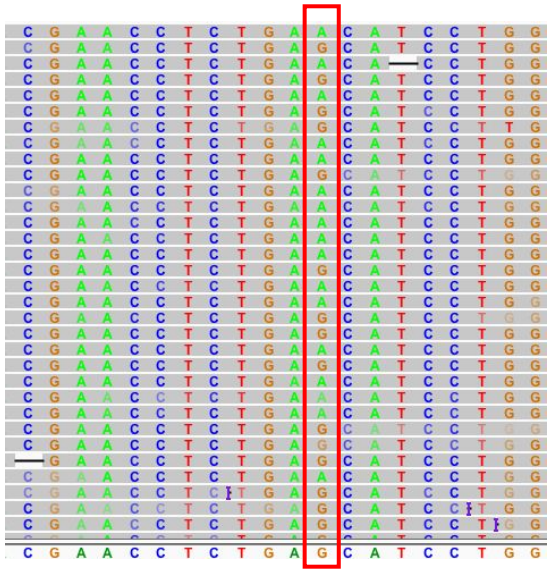
Гомозиготта



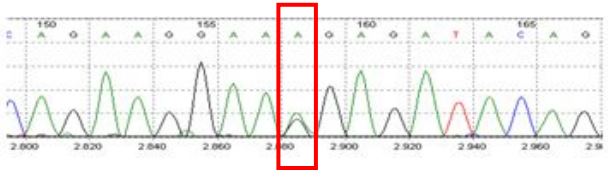
C/C



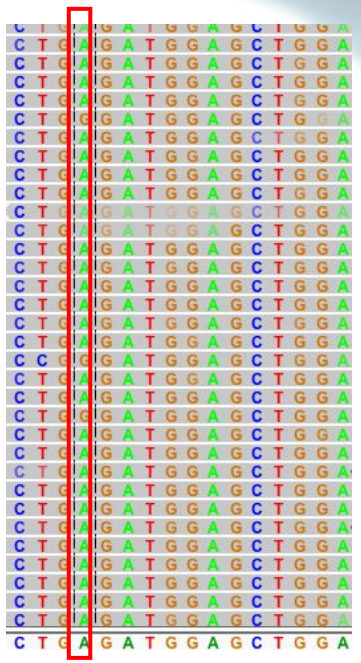
Гетерозиготта



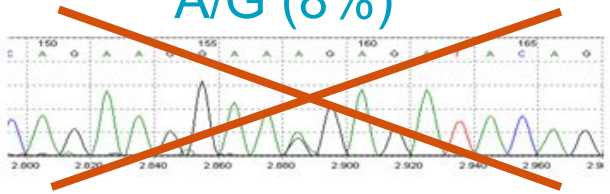
G/A



Минорный аллель



A/G (8%)



Насколько безгранична ваша фантазия?

- ✔ **Один секвенатор**
- ✔ **Один рабочий процесс**
- ✔ **Три чипа**
- ✔ **Множество задач!**

Технология Ion AmpliSeq™

Amplify → Digest → Ligate

- Экзомы
- CNV
- Панели «горячих точек»
- РНК Экспрессия
- Химеры
- Панели генов

helicon

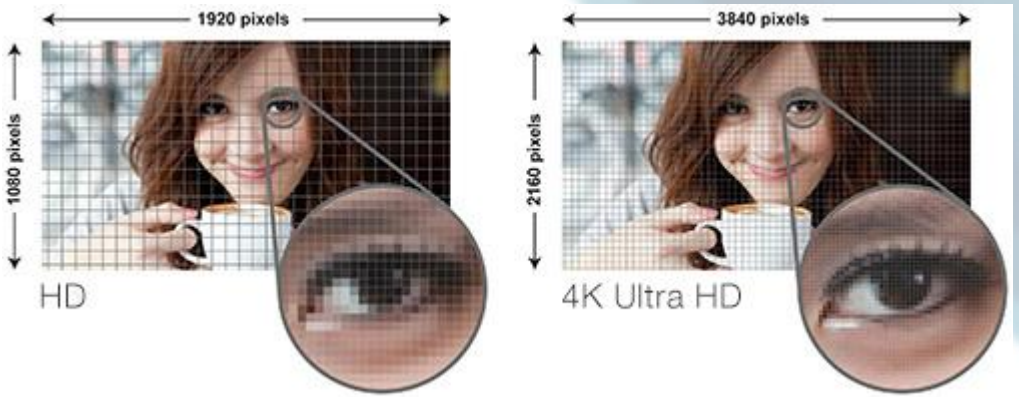
Единый автоматизированный рабочий процесс

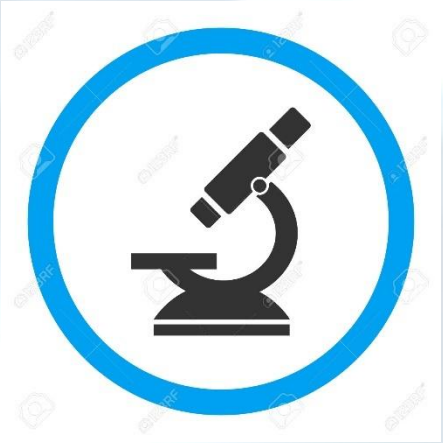
Выбор мишеней	Подготовка библиотек	Подготовка матрицы	Запуск секвенатора	Анализ данных

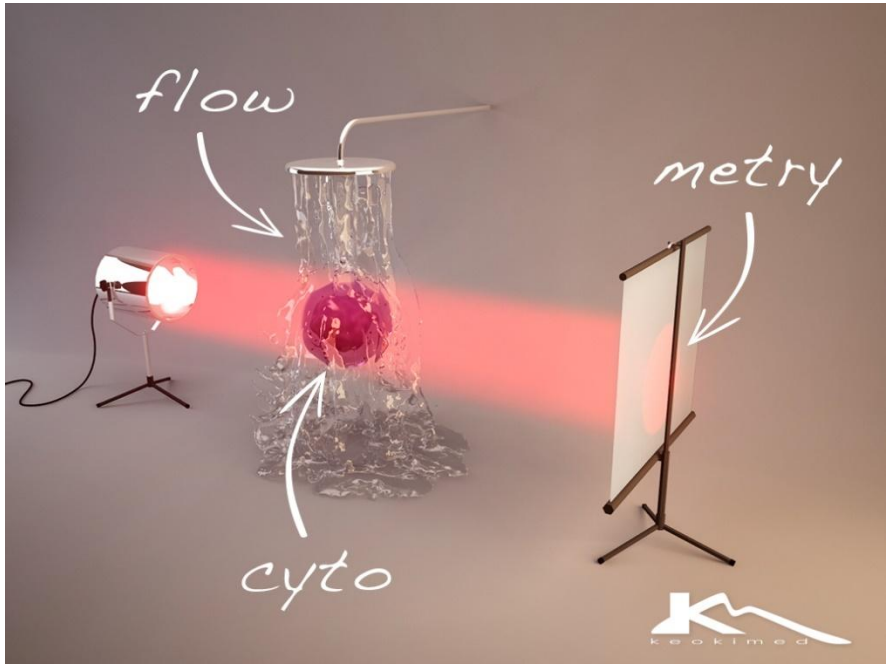
Решения для всех этапов: от ДНК до анализа данных

Ion AmpliSeq™ Designer Панели Ion AmpliSeq™	Библиотеки Ion AmpliSeq™ и система Ion Chef™	Система Ion Chef™	Системы Ion S5™ и S5 XL	Torrent Suite™ Ion Reporter™

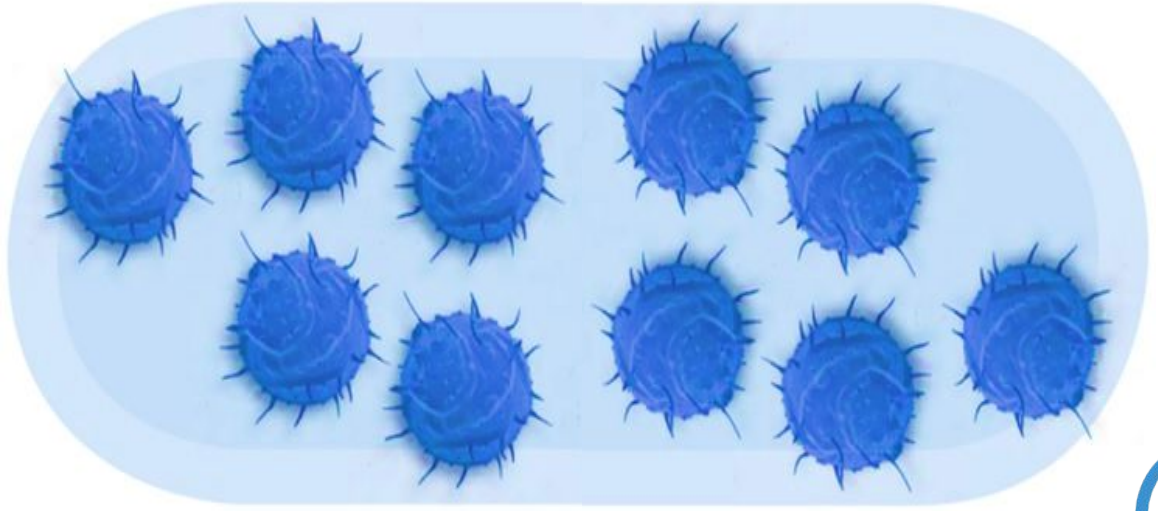
Клеточки


1920 pixels
1080 pixels
HD
3840 pixels
2160 pixels
4K Ultra HD



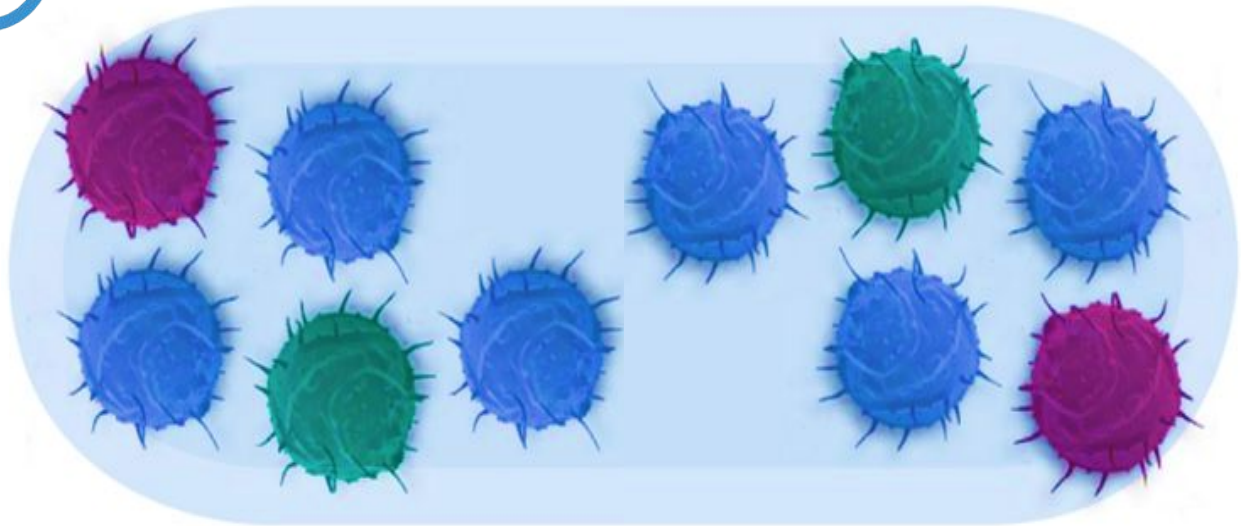

flow
metry
cyto

А что, если... каждая клетка уникальна ?



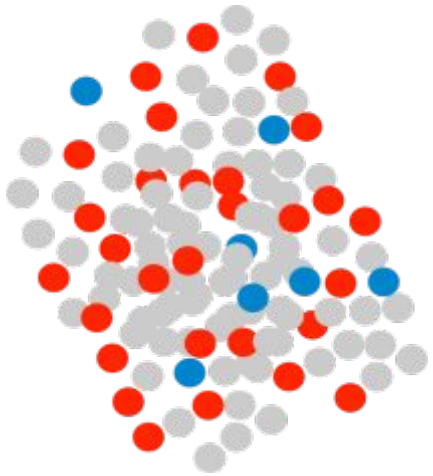
Реальность

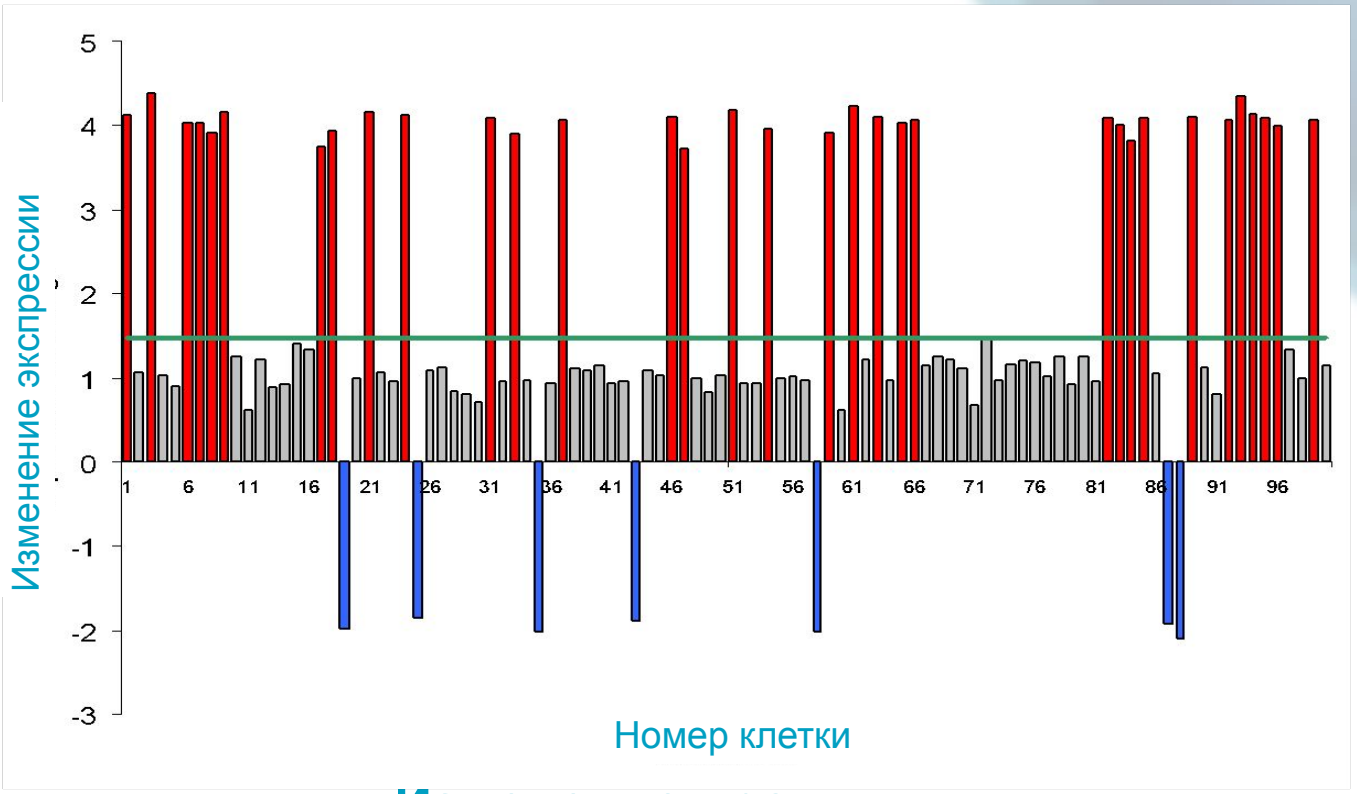
Ожидание



helicon

Изучение экспрессии генов

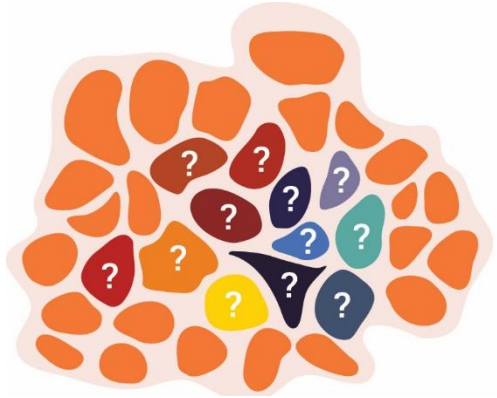




Изменение уровня экспрессии

- Популяция в целом: 1.5x
- Популяция A: 1x
- Популяция B: 0x
- Популяция C: 4x

Работа с единичными клетками



1. **Обогащение клеточной популяции**

- FACS
- Магнитная сепарация
- Центрифуги-рование
- Фильтрация

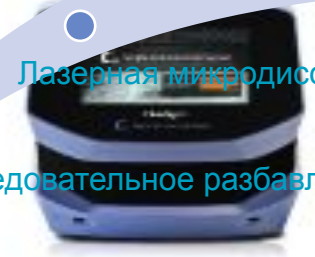
2. Изоляция отдельных клеток

3. Лизис, выделение нуклеиновых

4. Амплификация

Система захвата и процессирования единичных клеток

- FACS
- Лазерная микродиссекция
- Последовательное разбавление

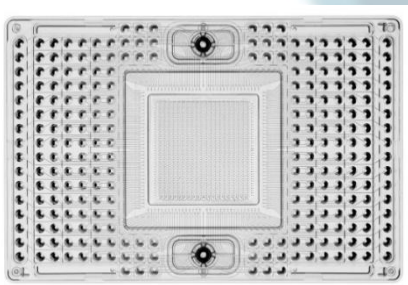


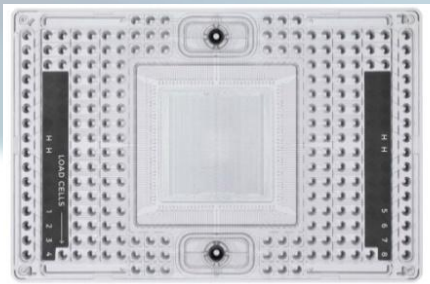
5. Создание библиотеки секвенирования

6. Секвенирование и анализ

Автоматическая хваталка-убивалка клеток C1

FLUIDIGM





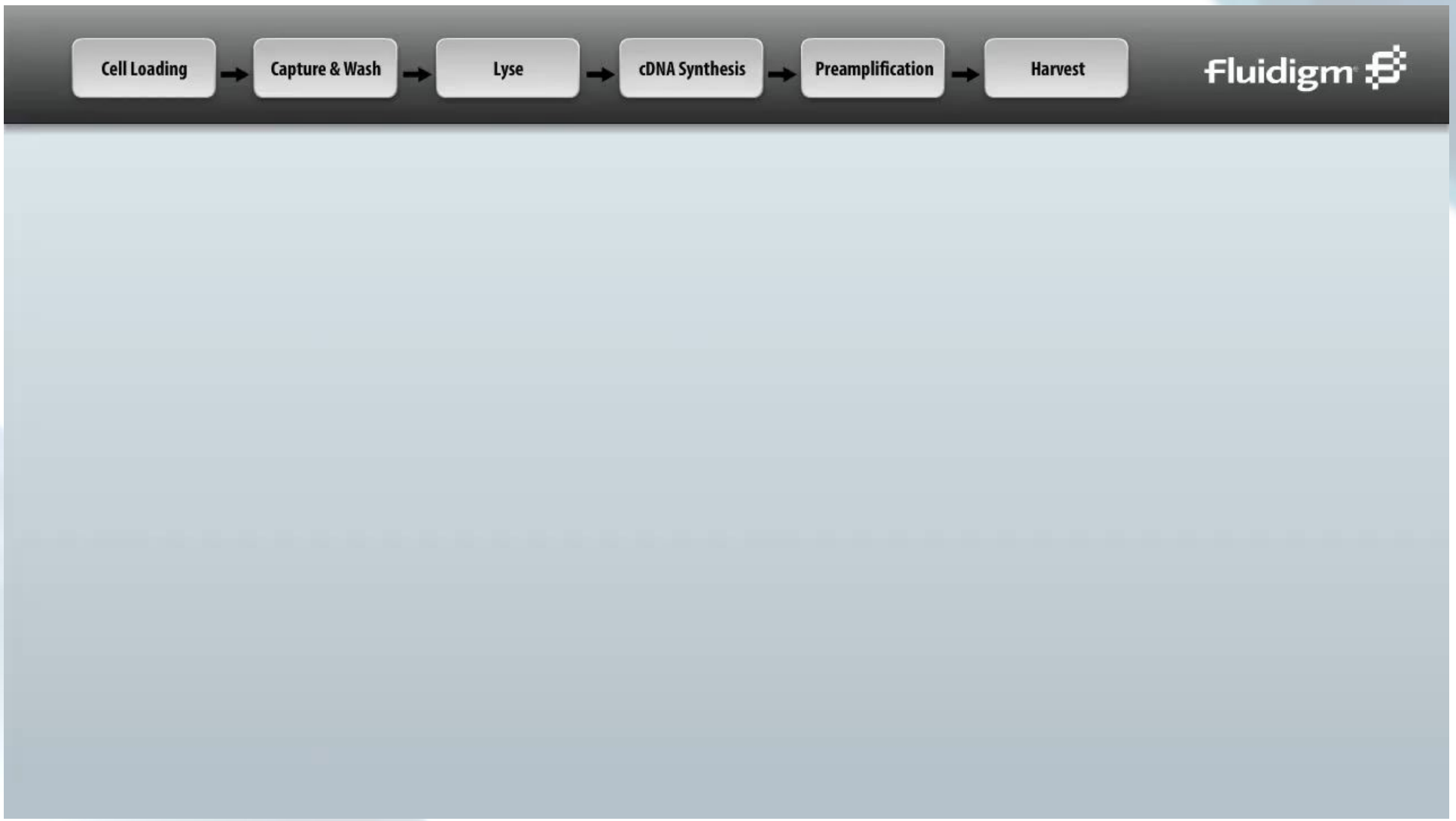
Функционал

- **Изолирование**
- **Окрашивание**
- **Лизис**
- **Обратная транскрипция**
- **Преамплификация**

Рабочий элемент	Чип
Принцип захвата клеток	По размеру
Размеры клеток	5 – 25 мкм
Количество клеток	96 (C1 IFC) либо 800 (C1 HT IFC)
Концентрация выделяемой ДНК	От 0,3 до 10 нг/мкл

helicon

Протокол C1 Single-Cell



Приложения Single Cell

Иммунология

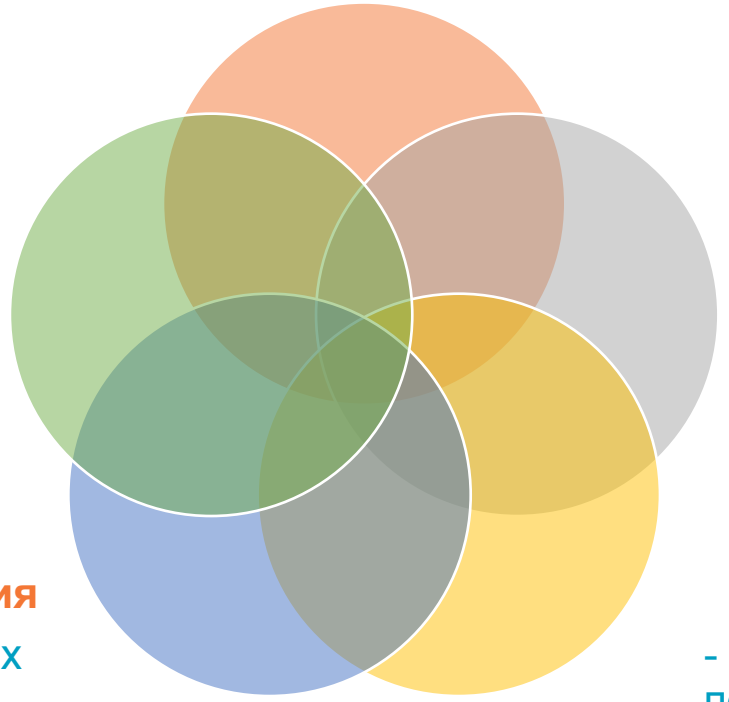
- Т-лимфоциты: развитие, клональность, строение рецепторов

Неврология

- клеточная структура и гетерогенность клеток мозга
- изучение неврологических заболеваний

Онкология

- циркулирующие опухолевые клетки
- клональность и развитие опухоли
- поиск новых маркеров



Биология развития

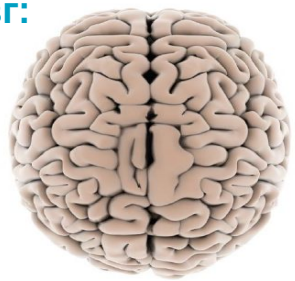
- стволовые клетки и их программирование
- эмбриогенез

Фундаментальная биология

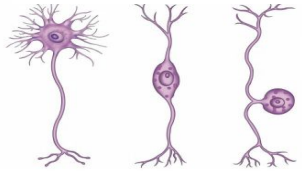
- типирование клеточных популяций
- поиск новых популяций клеток

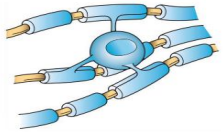
Профилирование клеточных популяций

Человеческий мозг:

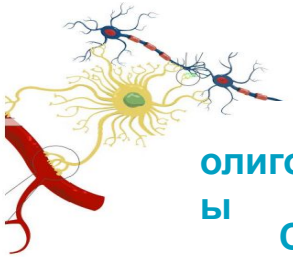


нейроны





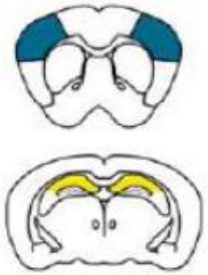
астроциты



олигодендроциты

И многие другие?

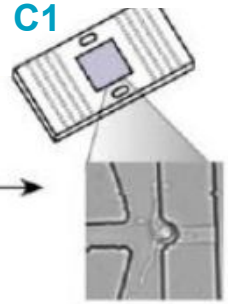
Соматосенсорная кора



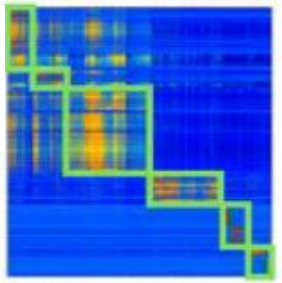
Гиппокампус

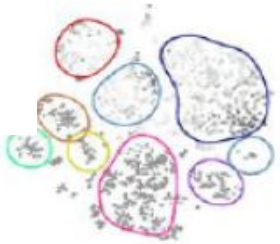
Суспензия клеток ткани

Захват и процессирование клеток на системе C1



Секвенирование мРНК единичных клеток

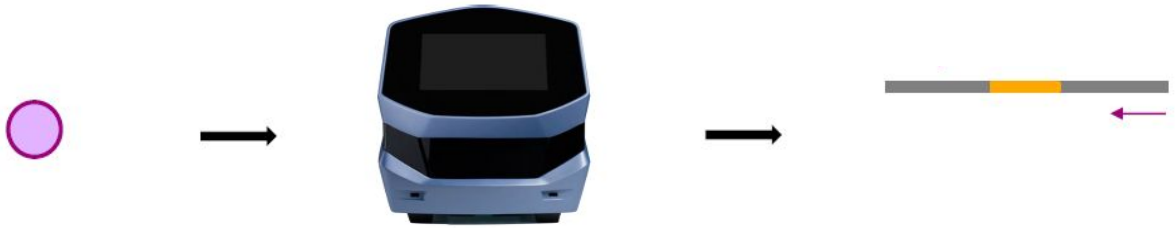




3005 клеток
9 классов
47 подклассов

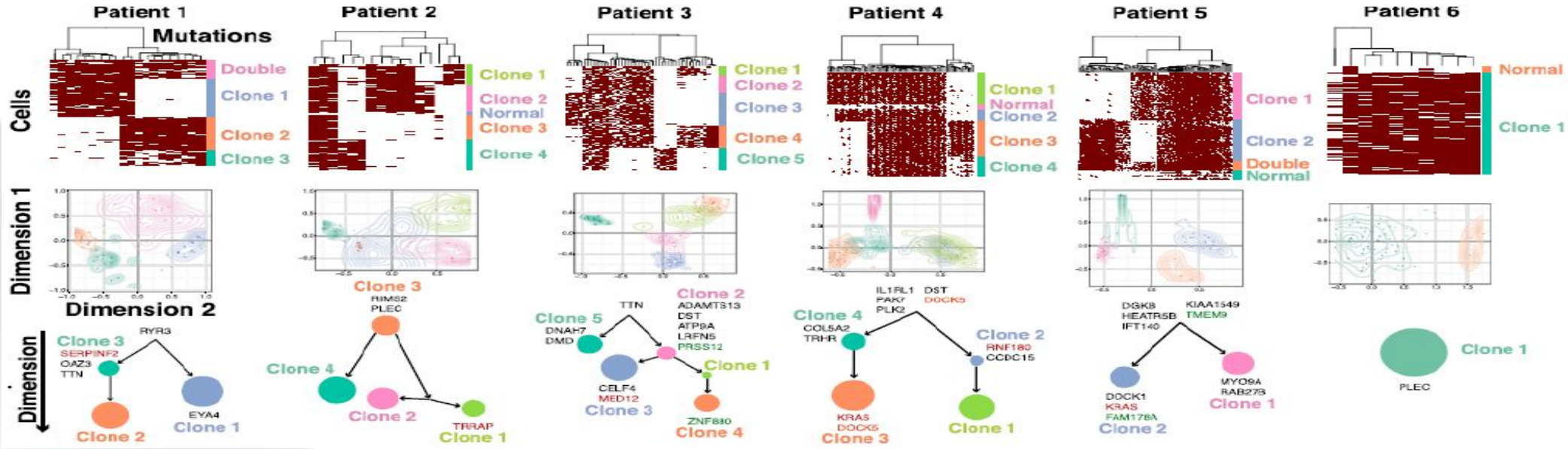
Zeisel et al. *Science Express* (2015)

Определение клональной структуры опухоли



Амплификация полногеномной ДНК единичной клетки

Обогащение целевыми участками с потенциально важными мутациями

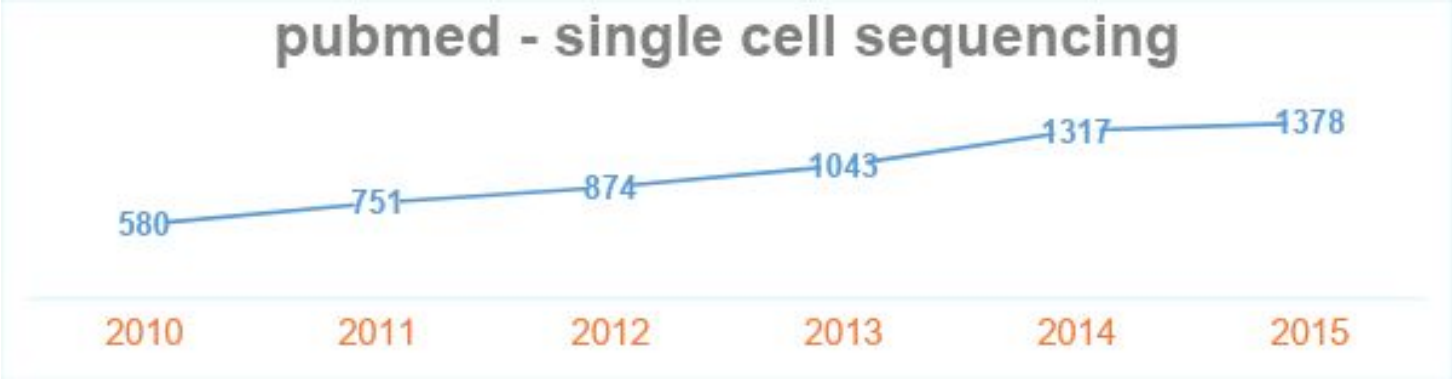


Gawad C. et al, “Dissecting the clonal origins of childhood acute lymphoblastic leukemia by single-cell genomics”, *PNAS*, Nov 2014

helicon

Вернёмся к нашим баранам

- Телевидение изобрели в 1928 году
- Секвенировать начали в 1977
- Единичные клетки активно изучают меньше 10 лет
- Что же будет дальше?



Single cell лаборатория от helicon

20-и летний опыт компании в организации ведущих лабораторий России

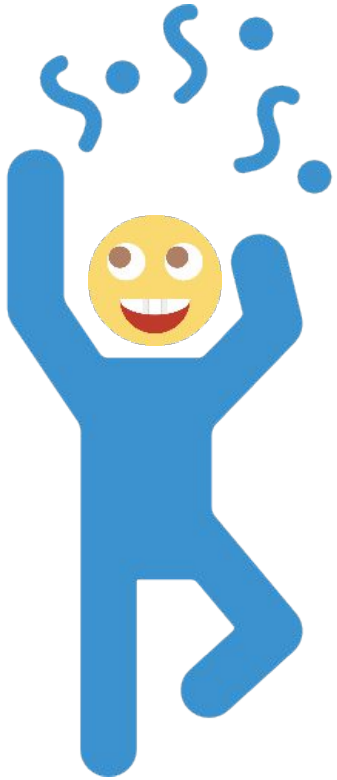
Сортер клеток S3e, Bio-Rad

Система C1, Fluidigm

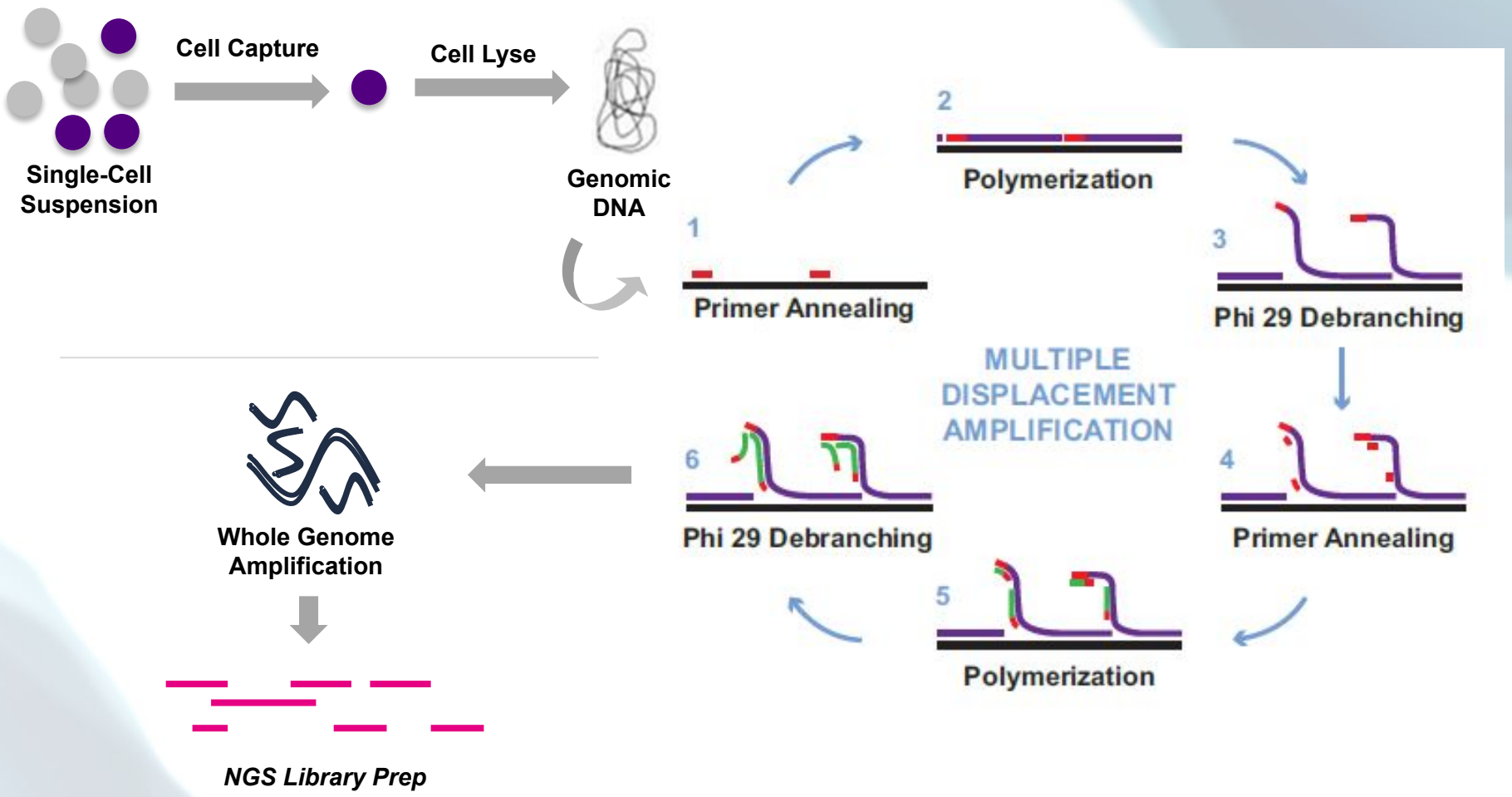
Микроскоп ZOE, Bio-Rad

Секвенатор S5 XL, Thermo Fisher

Счетчик Countess II, Thermo Fisher



Thank you!
Let’s Do Science! ☺

helicon

Полногеномная амплификация