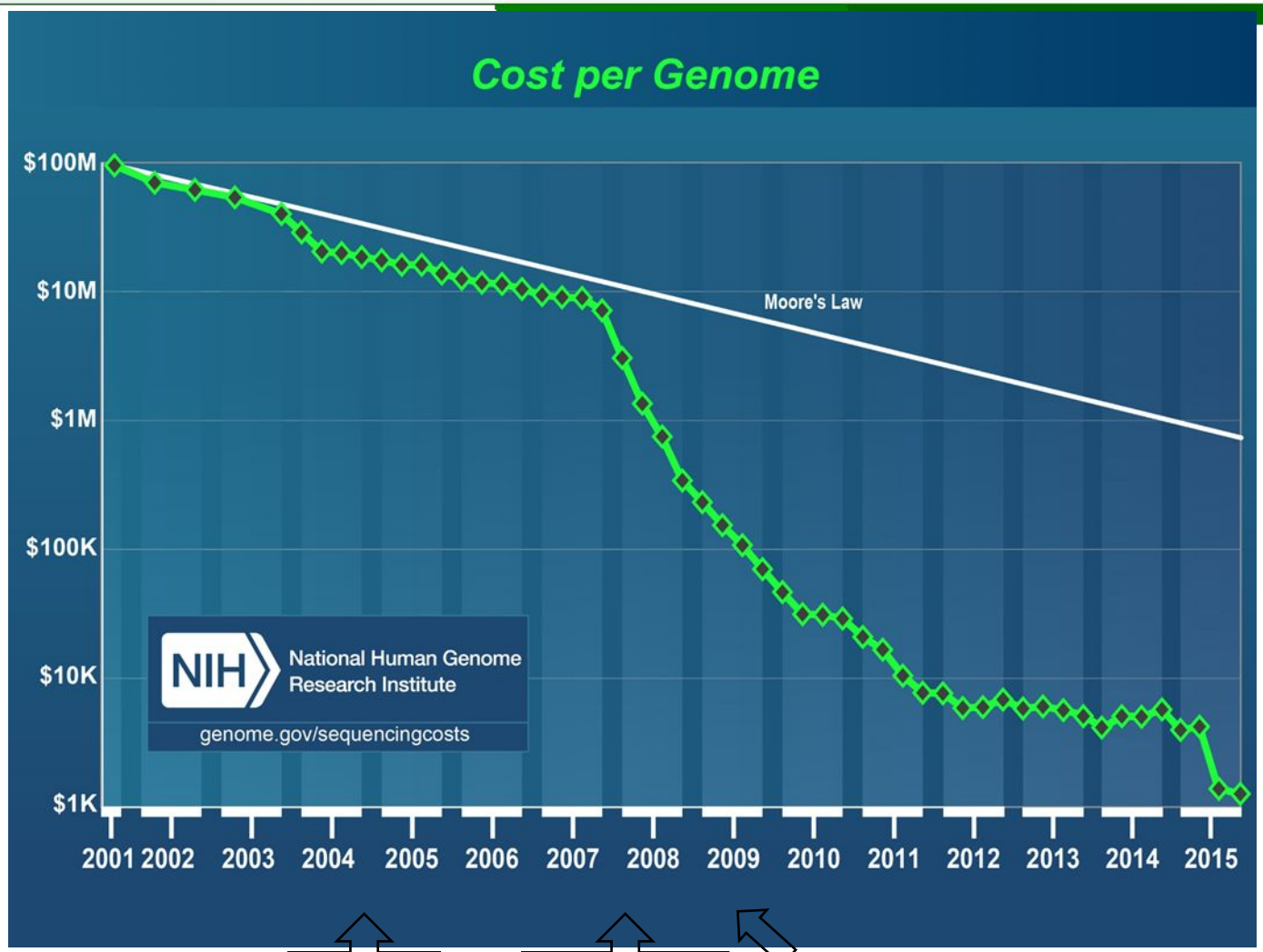
Секвенирование нового поколения (NGS)

Васильев Геннадий Владимирович

Институт цитологии и генетики СО РАН

Революция цены в геномных исследованиях



454 GS20

1000 Геномов

SOLiD 3.0
Illumina GA2

Второе поколение секвенаторов – NGS – создатели геномики

Roche FLX Titanium

Illumina HiSeq

SOLiD 5500

Ion Proton

Принцип пиросеквенирования

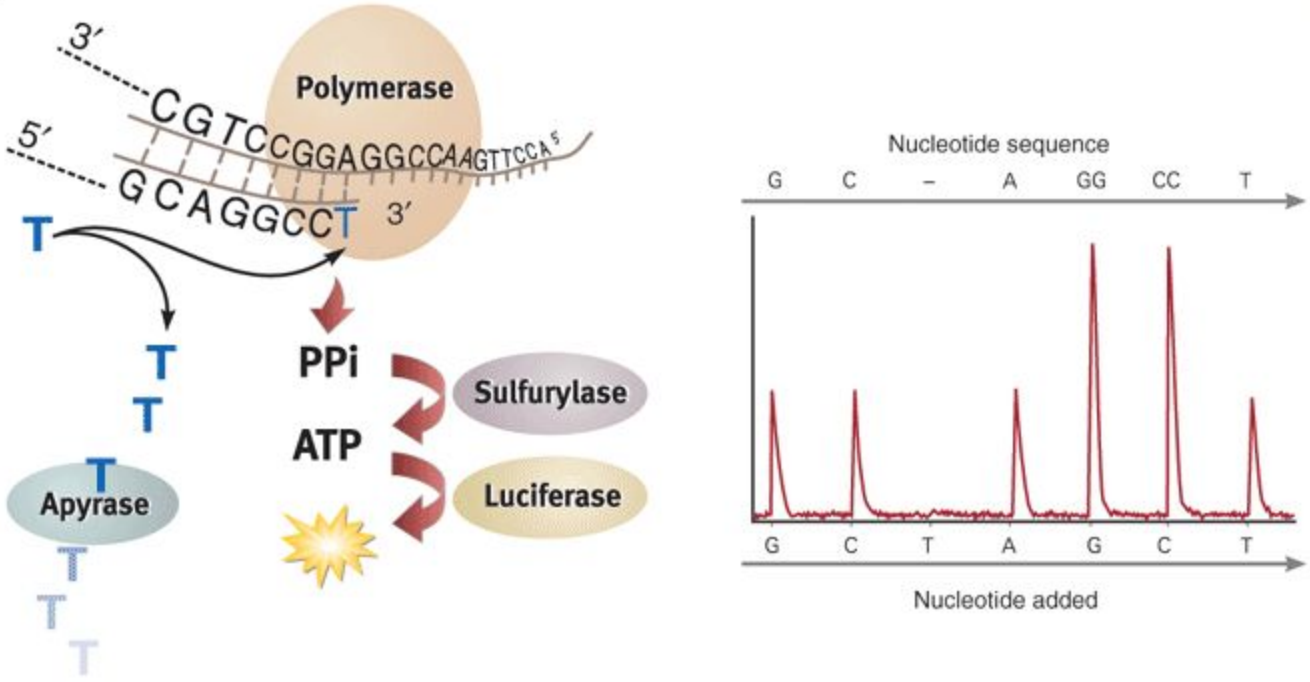
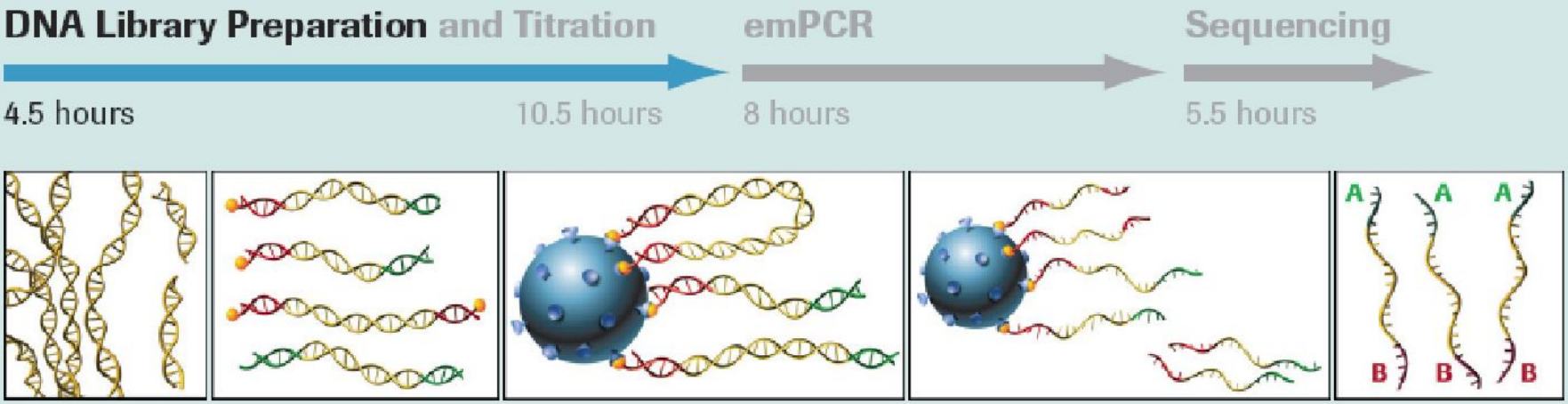


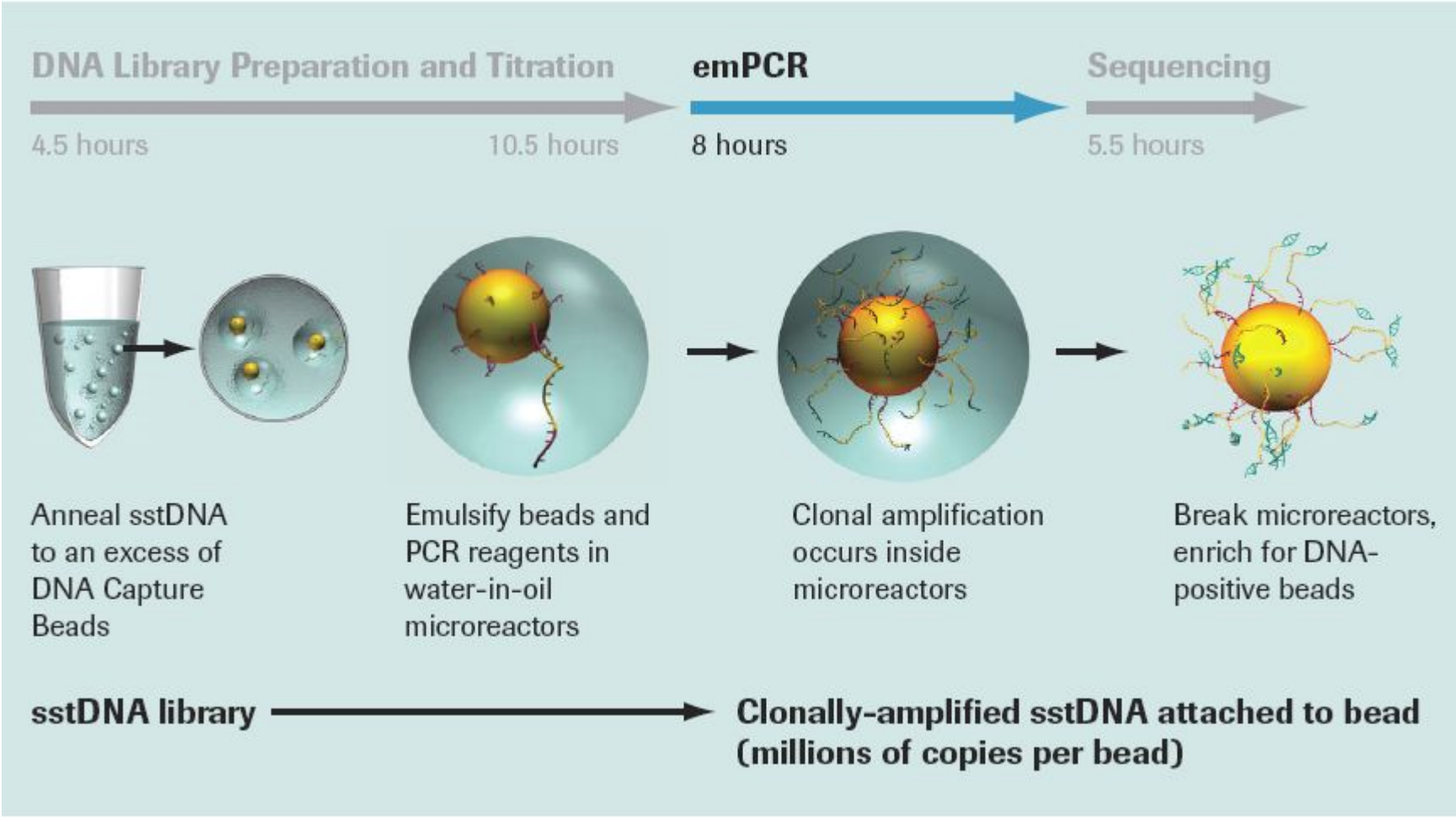
Figure 1 | The principle of Pyrosequencing and the output Pyrogram™. Double peak heights indicate incorporations of two nucleotides in a row.

Пиросеквенирование: приготовление библиотек



- Genome fragmented by nebulization
- No cloning; no colony picking
- sstDNA library created with adaptors. The adaptors are used as primers, and for binding to beads.
- A/B fragments selected using streptavidin-biotin purification

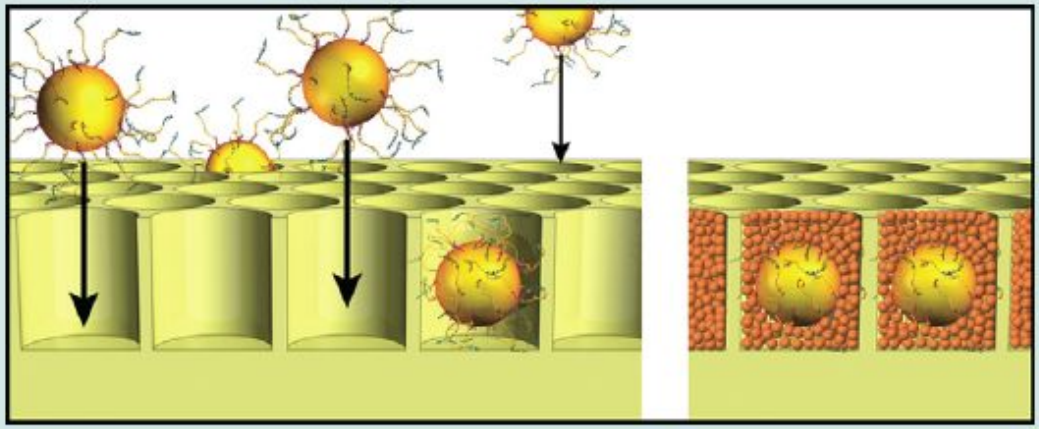
Пиросеквенирование: ПЦР в эмульсии



Пиросеквенирование: секвенирование

DNA Library Preparation and Titration → emPCR → **Sequencing**

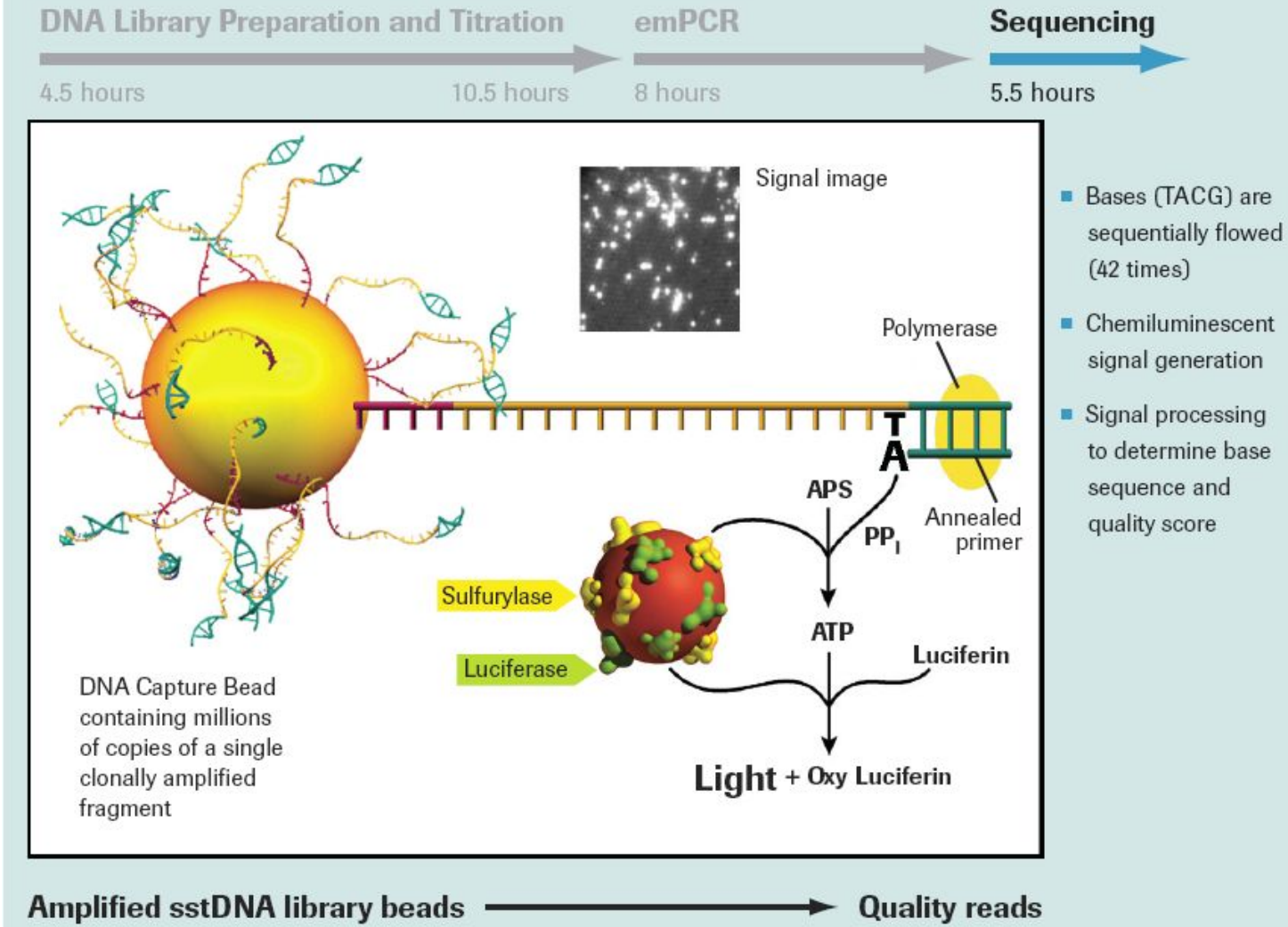
4.5 hours | 10.5 hours | 8 hours | 5.5 hours



- Well diameter: average of 44 µm
- A single clonally amplified sstDNA bead is deposited per well
- 200,000 reads obtained in parallel on large-format PicoTiterPlate device

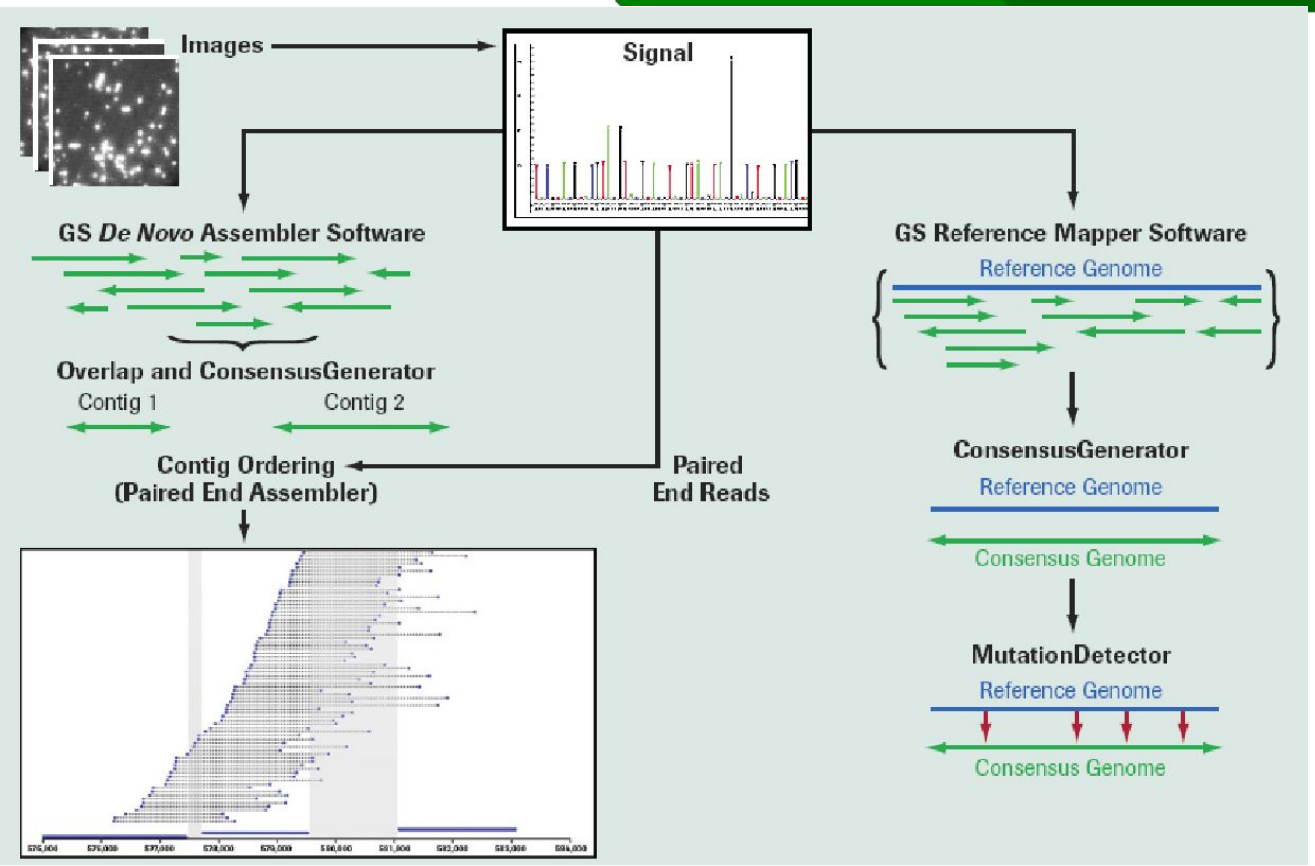
Amplified sstDNA library beads → **Quality reads**

Пиросеквенирование: секвенирование



- Bases (TACG) are sequentially flowed (42 times)
- Chemiluminescent signal generation
- Signal processing to determine base sequence and quality score

Пиросеквенирование: анализ результатов



Особенности:

1) Лучшее качество и высокая цена

2) Невозможность разрешения политрактов длиннее 5-7-9 осн.

3) Длинные фрагменты (600-800 п.н.) без использования mate-pair библиотек

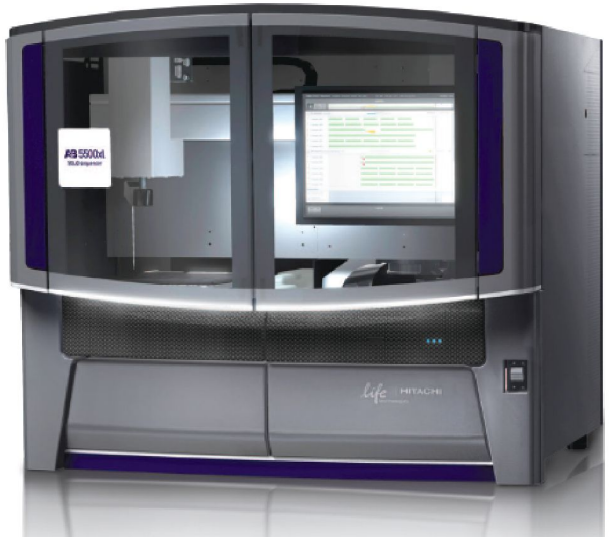
4) Активно применялся для секвенирования *de novo* и метагеномов

Ресеквенирование генома *S. cerevisiae* - 12,070,820 (12 Mb) при 20х покрытии
Total Genomic Coverage **95.14%,** Number of Contigs – **694**, Average Contig Size **16.547** bases

SOLiD

SOLiD 4

SOLiD 5500



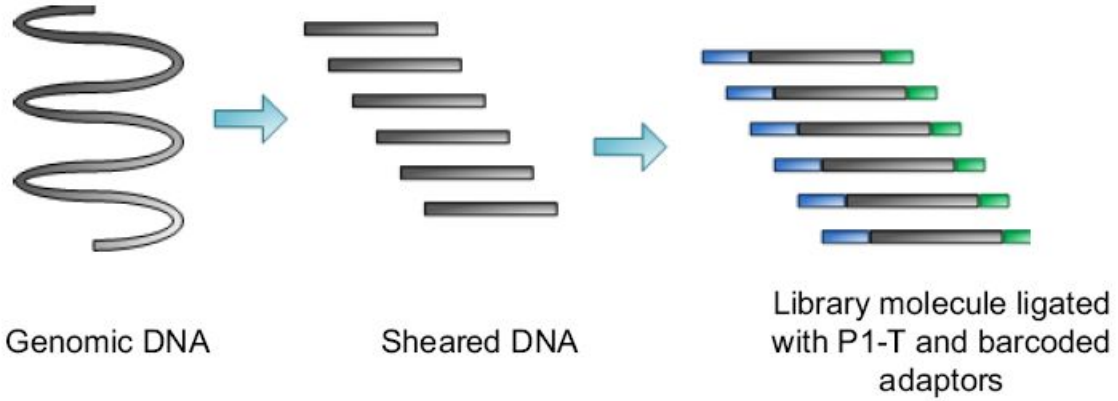
Особенности:

1) Самые короткие чтения 50 или 75 п.н., используется при ресеквенировании и анализе транскриптомов

2) Есть чтение mate-pair библиотек

3) Достаточно высокая точность при использовании специализированного ПО

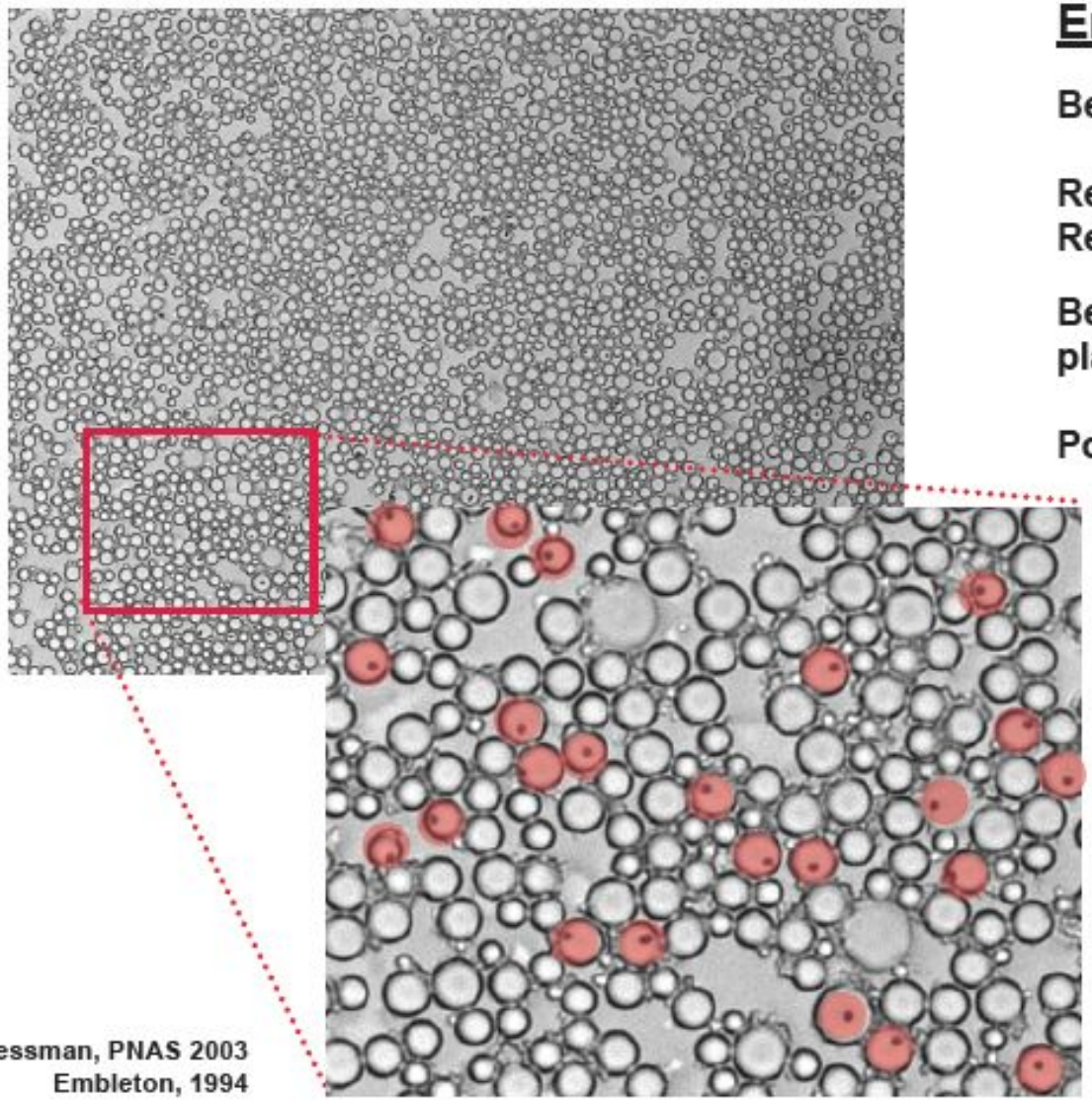
Шаг 1: Подготовка библиотек



Fragment Library

Mate-Paired Library

SOLiD: результат ПЦР в эмульсии

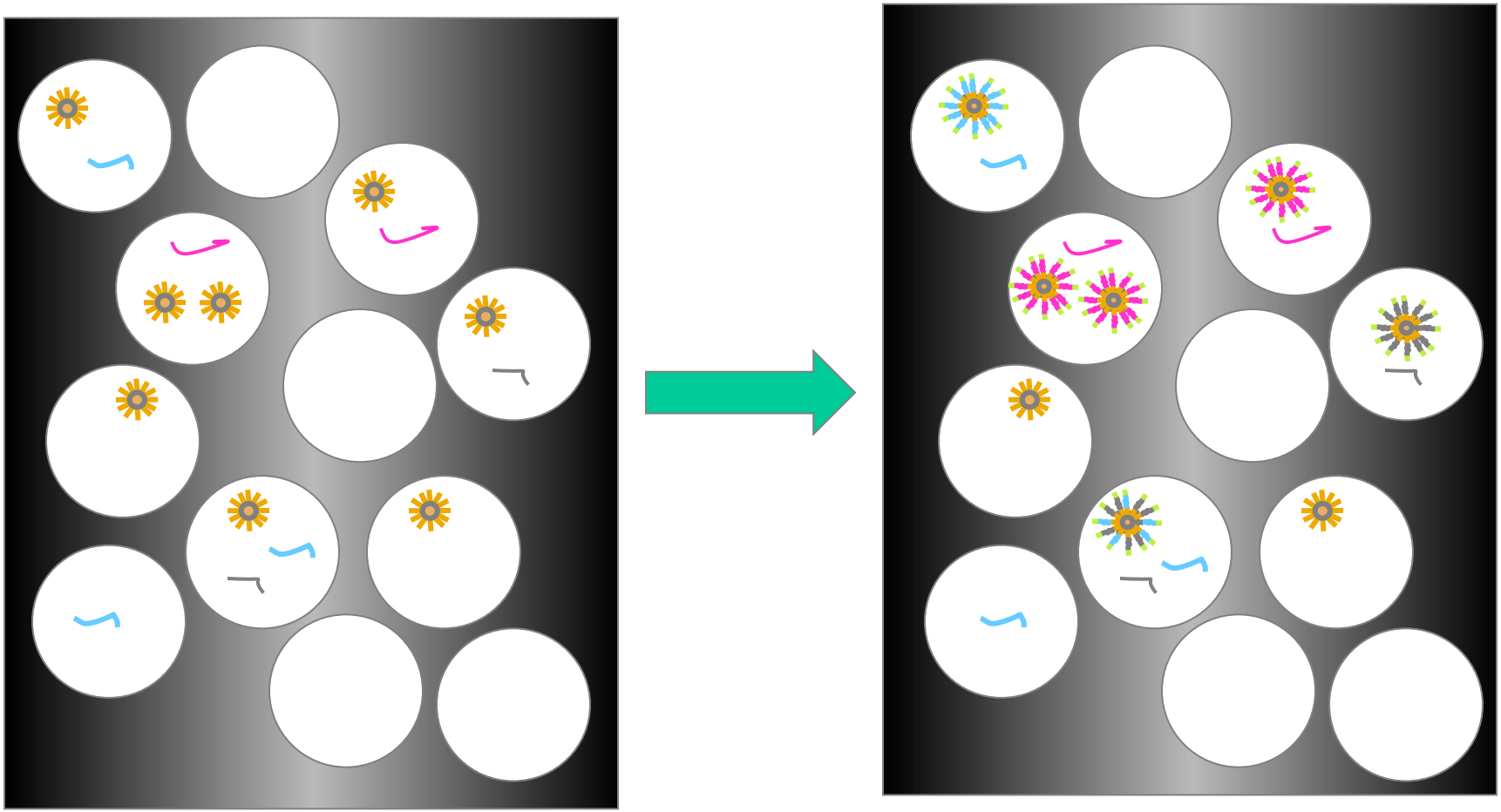


Dressman, PNAS 2003
Embleton, 1994

Emulsion Metrics

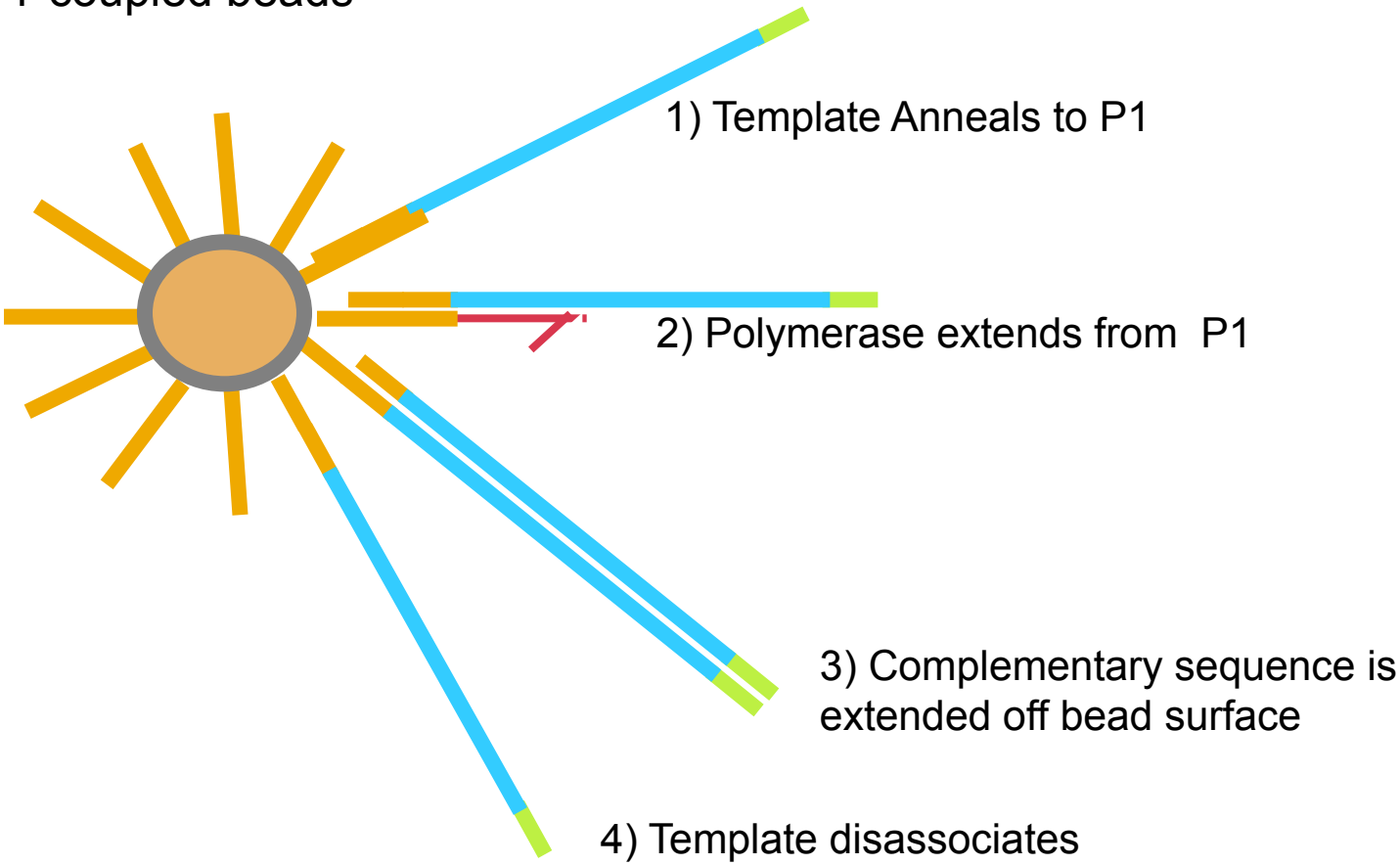
Bead size:	1 μm
Reactor size:	4 μm
Reactor volume:	34 fL
Beads / emulsion plate (96-well):	1.6×10^9
Post Enrichment:	$150 – 300 \times 10^9$

E-PCR

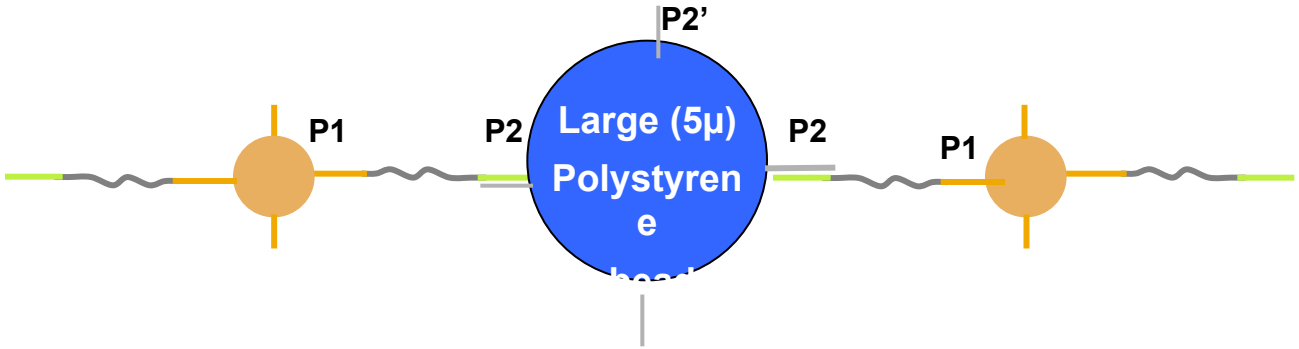


E-PCR

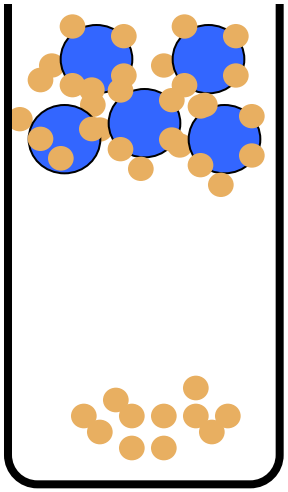
P1-coupled beads



Шаг 3: обогащение полученных бидсов



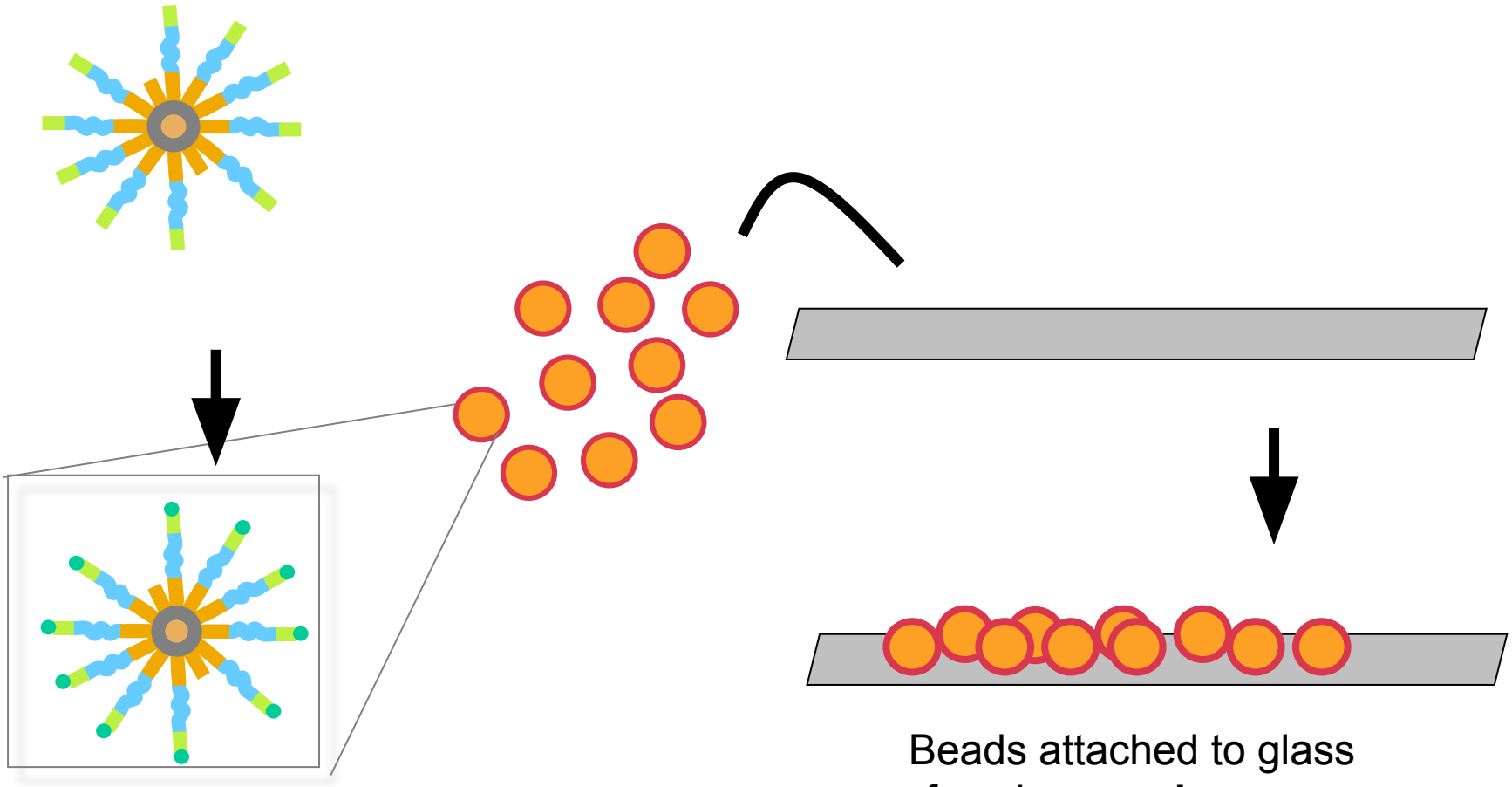
Centrifuge in glycerol gradient



Supernatant
Captured beads with templates

Pellet
Beads with no template

Шаг 4: 3′-модификация концов и нанесение бидсов



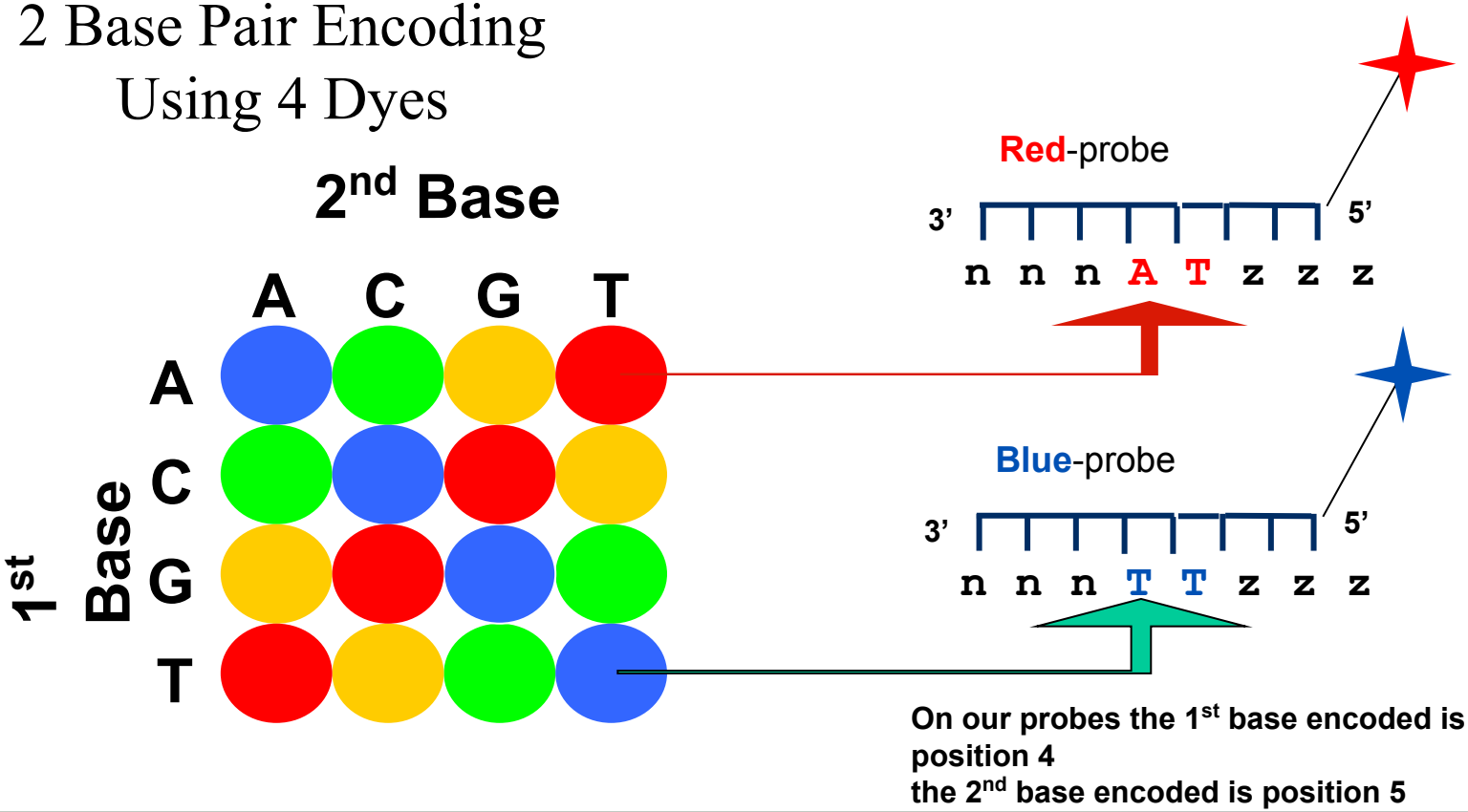
Beads attached to glass surface in a **random** array

SOLiD: Пробы

1,024 Octamer Probes (4^5)

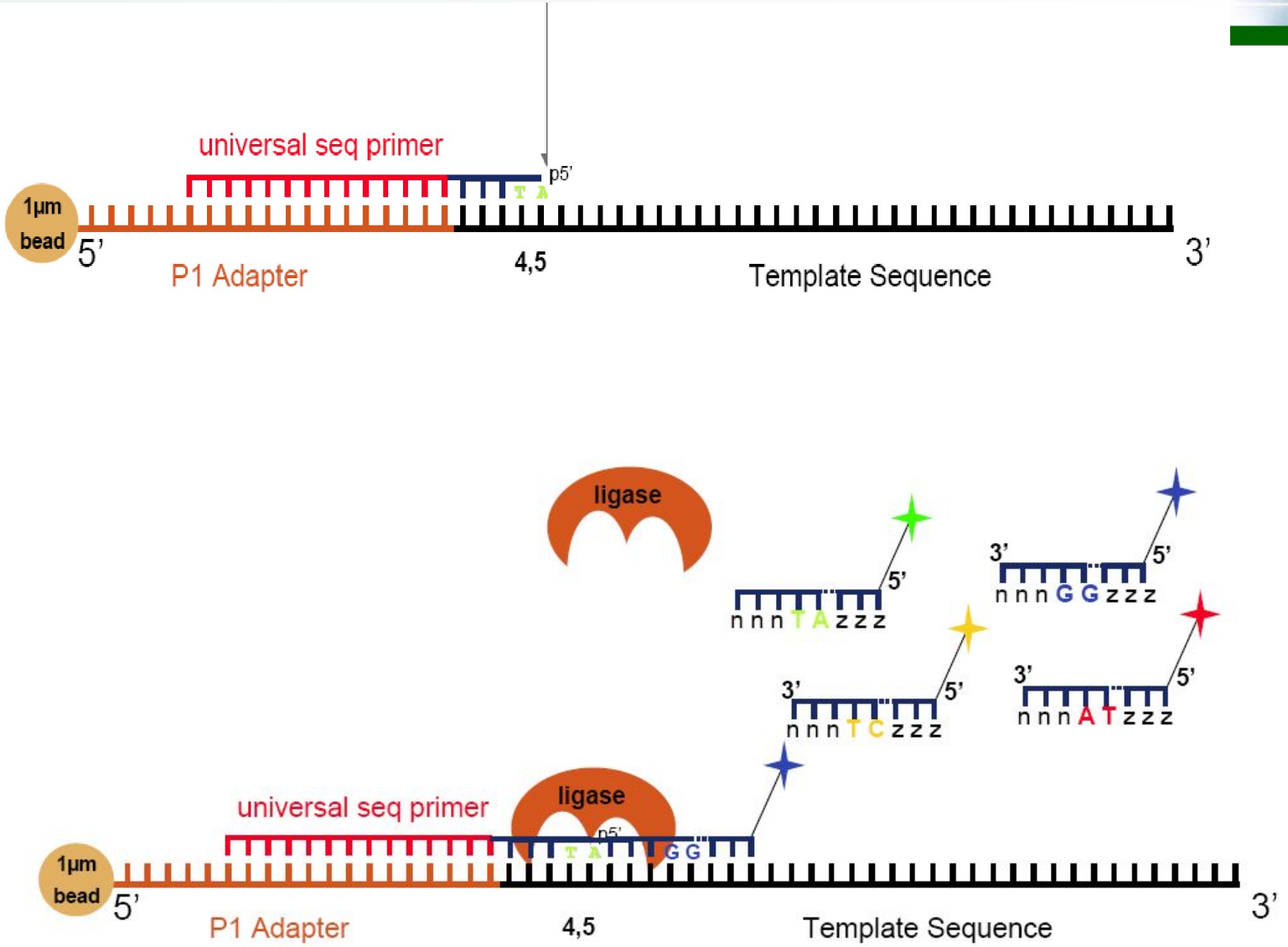
4 Dyes, 4 dinucleotides, 256 probes per dye

2 Base Pair Encoding
Using 4 Dyes

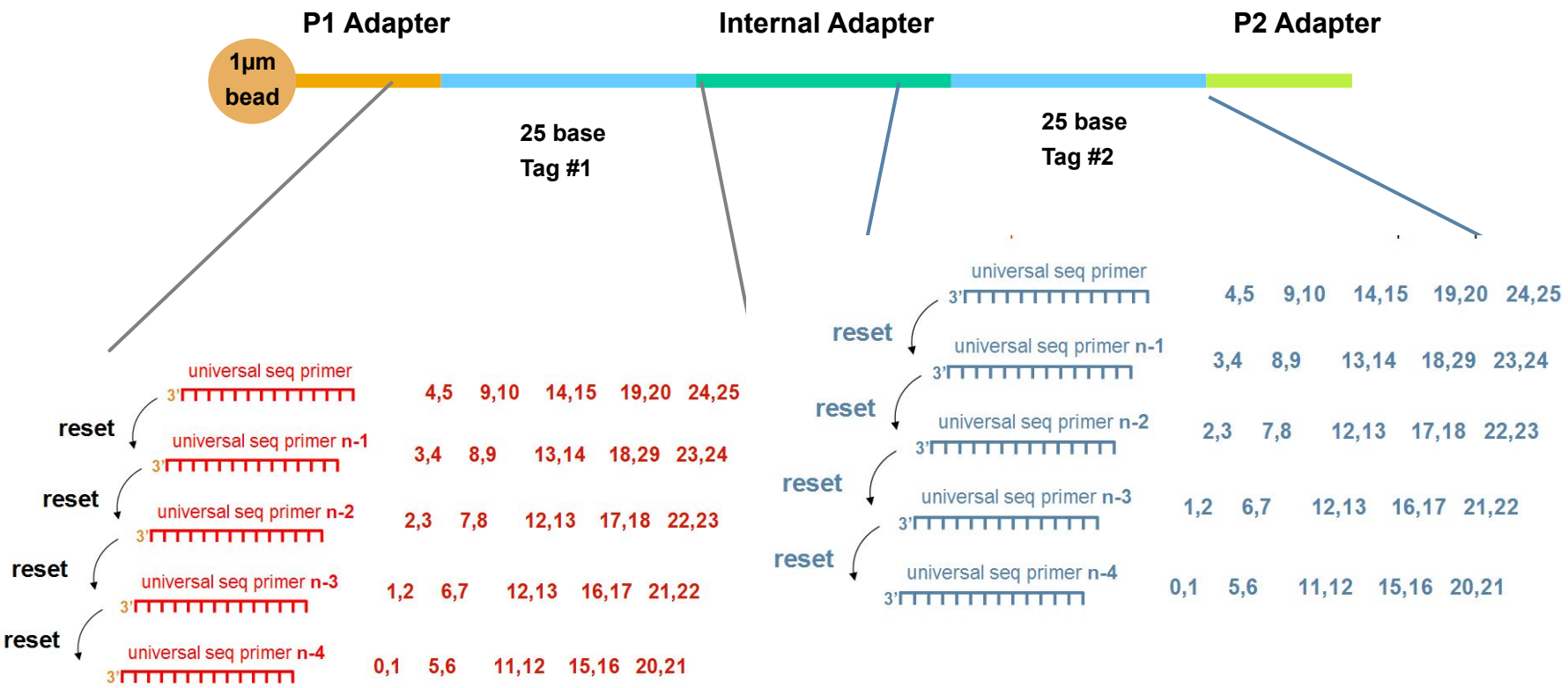


On our probes the 1st base encoded is position 4
the 2nd base encoded is position 5

SOLiD

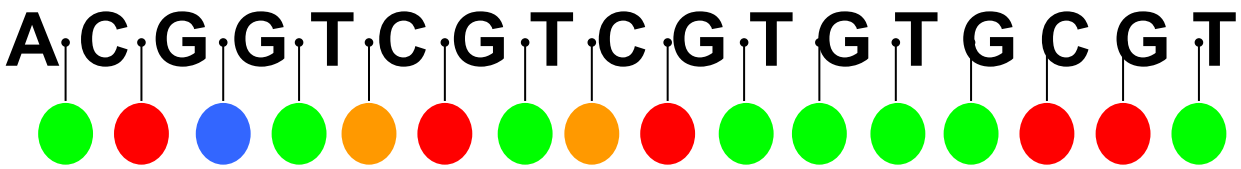


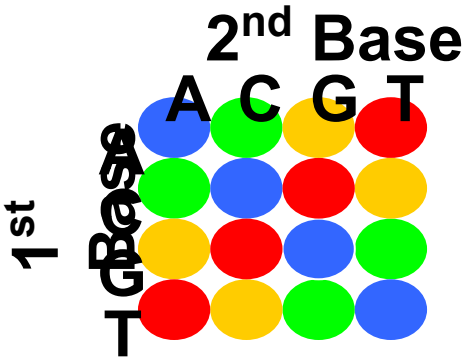
SOLiD



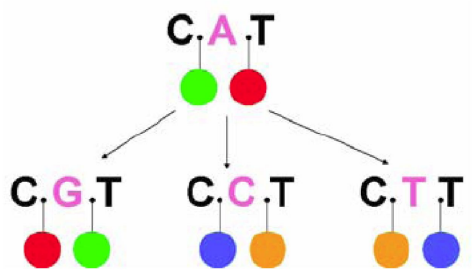
SOLiD read

A C G G T C G T C G T G T G C G T

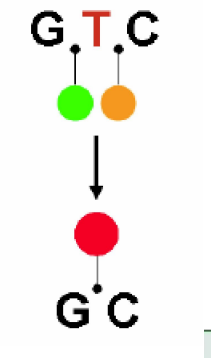




SNP

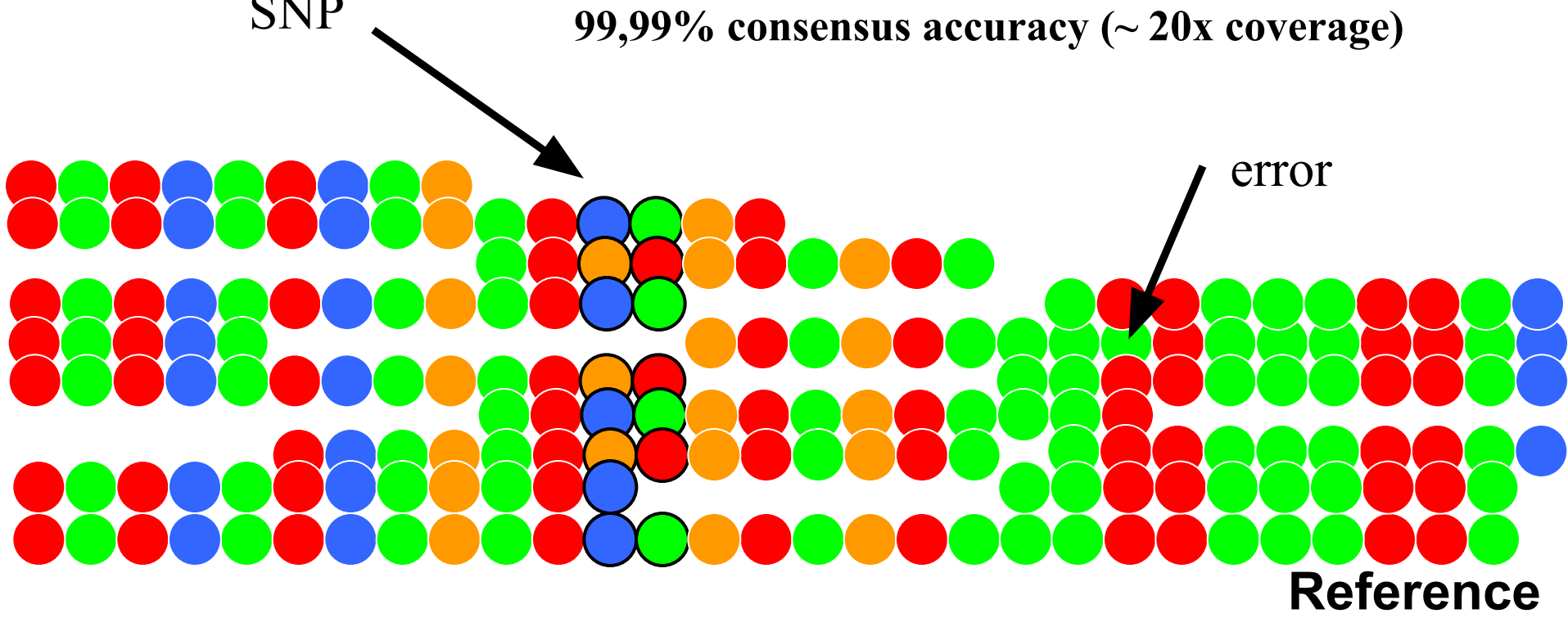


Insertion / Deletion



SOLiD: SNP и ошибки чтения

98% raw base accuracy
99,99% consensus accuracy (~ 20x coverage)



SNP 2 colors change

Технология фирмы Illumina – HiSeq, MySeq, NextSeq, NovaSeq

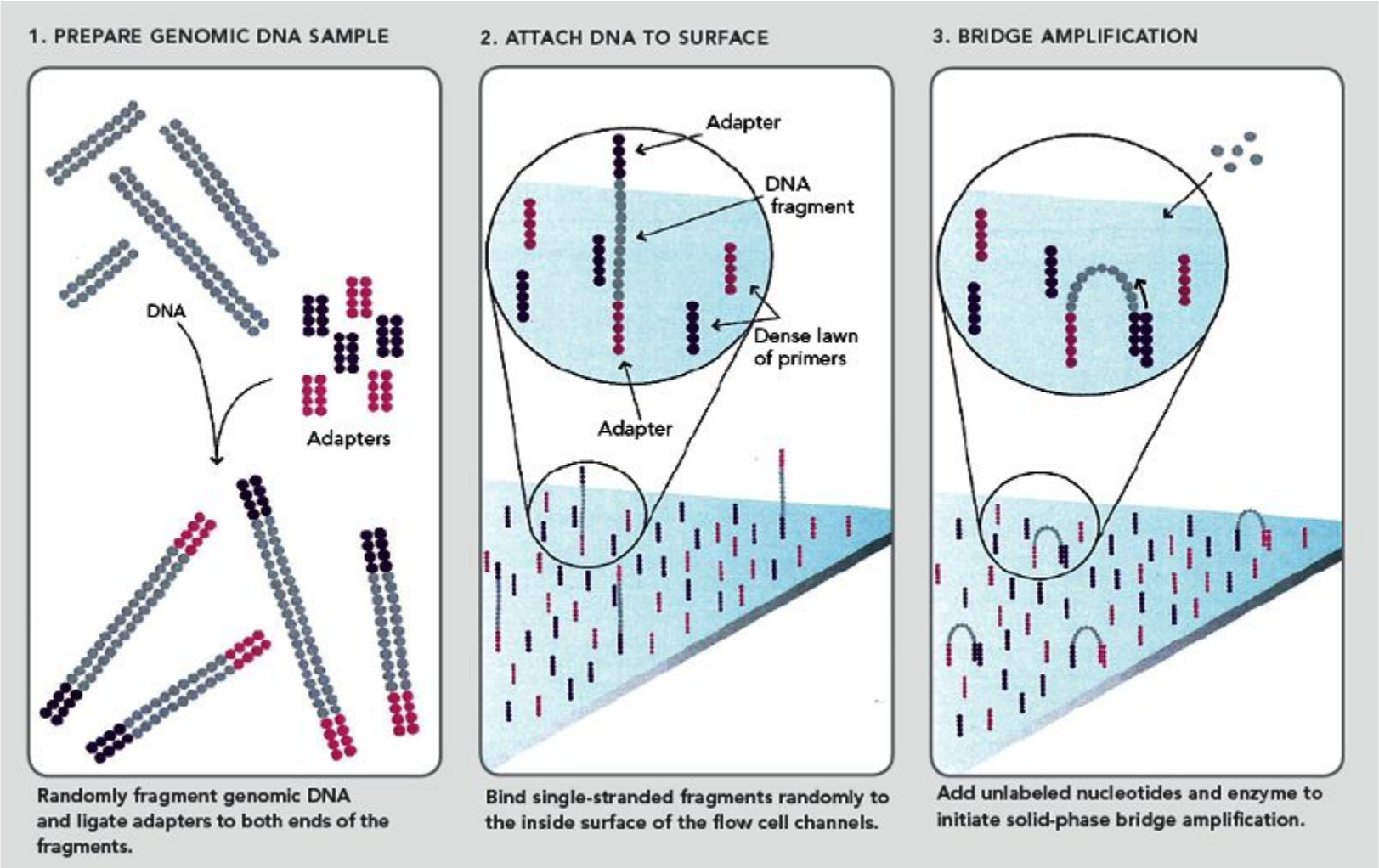
Особенности:

1)Чтения 50-300 п.н. прямые либо парные

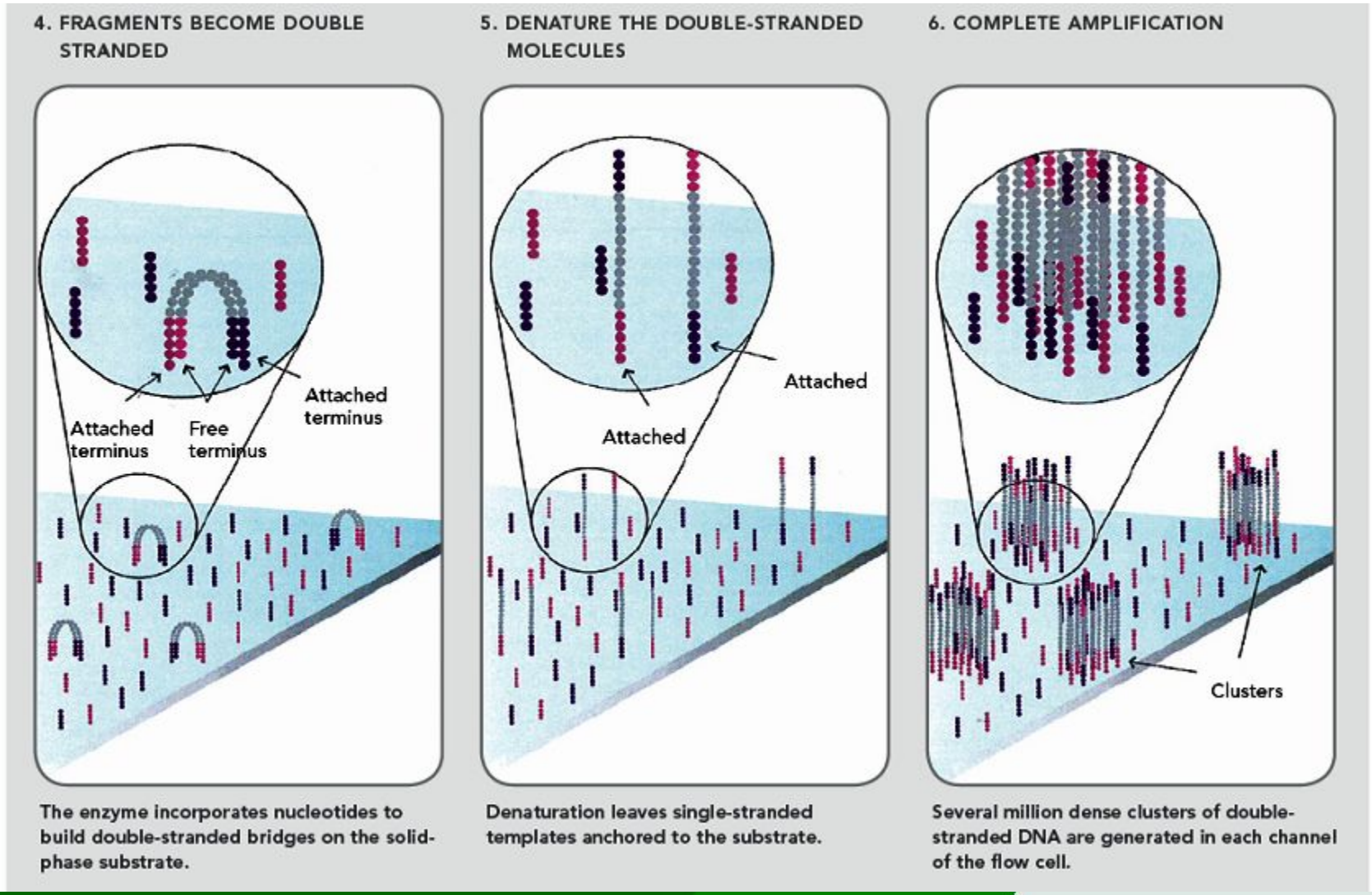
2)Есть чтение mate-pair библиотек

3) Доминирующая на рынке (80-90%), применяется везде.

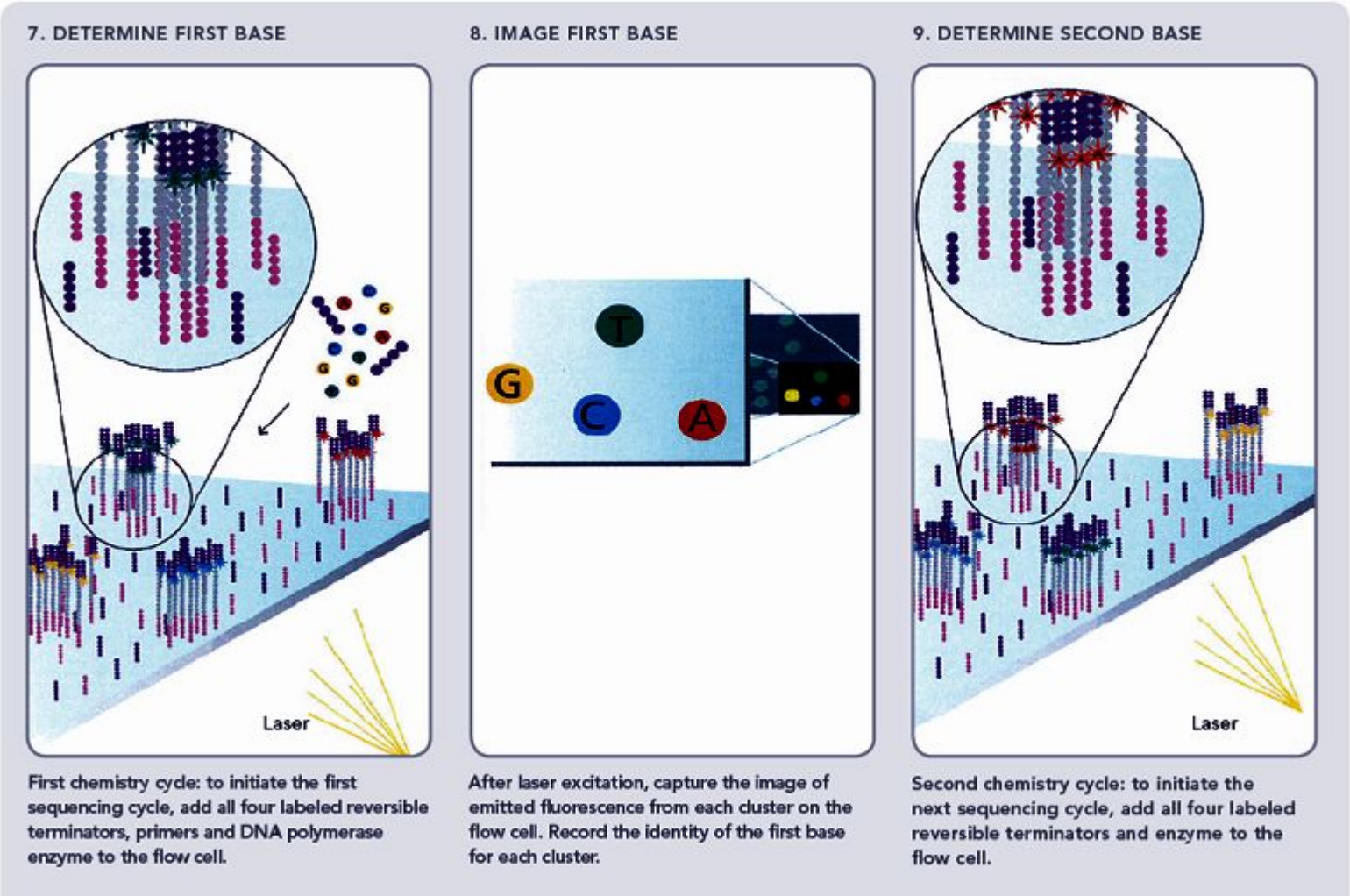
Illumina



Illumina

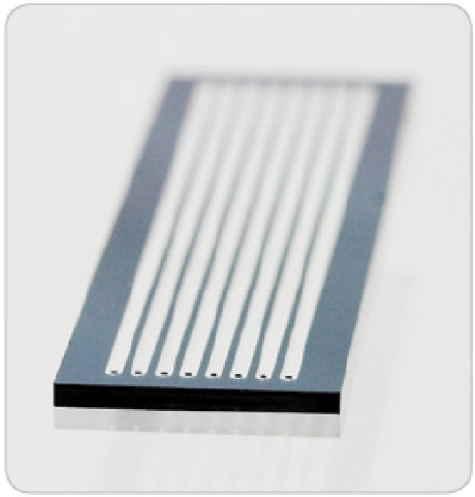


Illumina

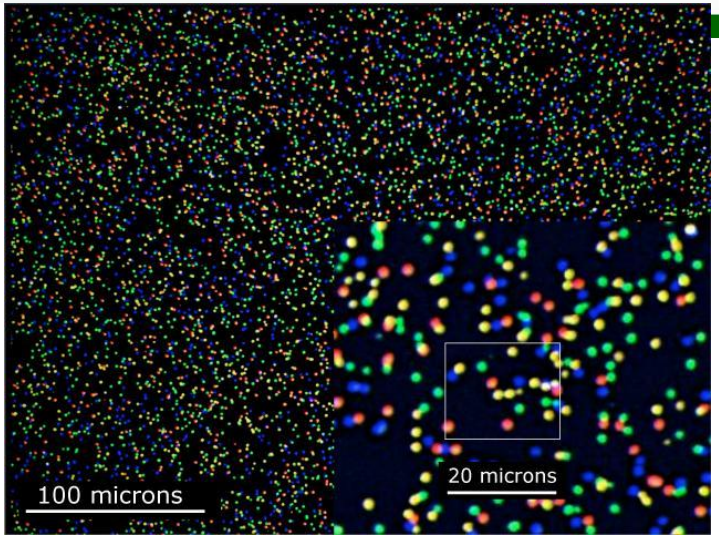


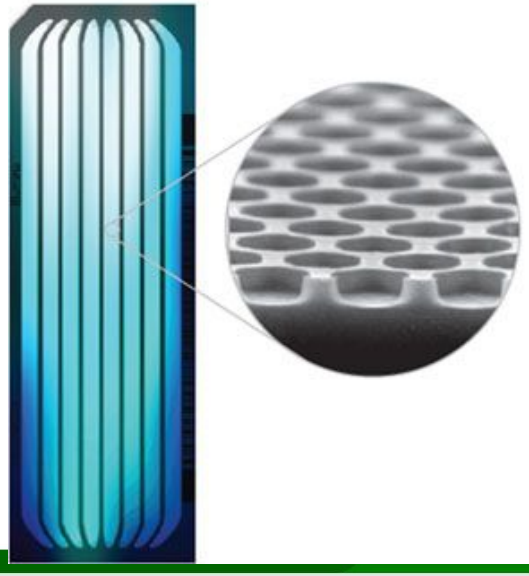
Illumina GA и HiSeq vs NovaSeq

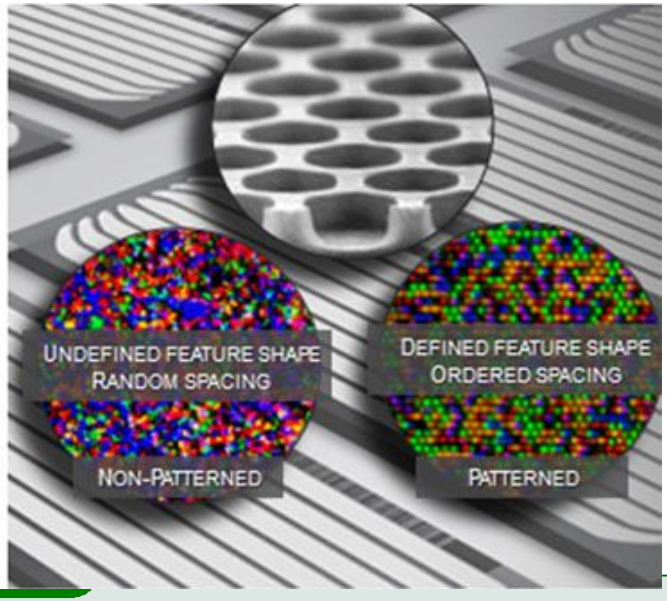
FIGURE 1: ILLUMINA GENOME ANALYZER FLOW CELL



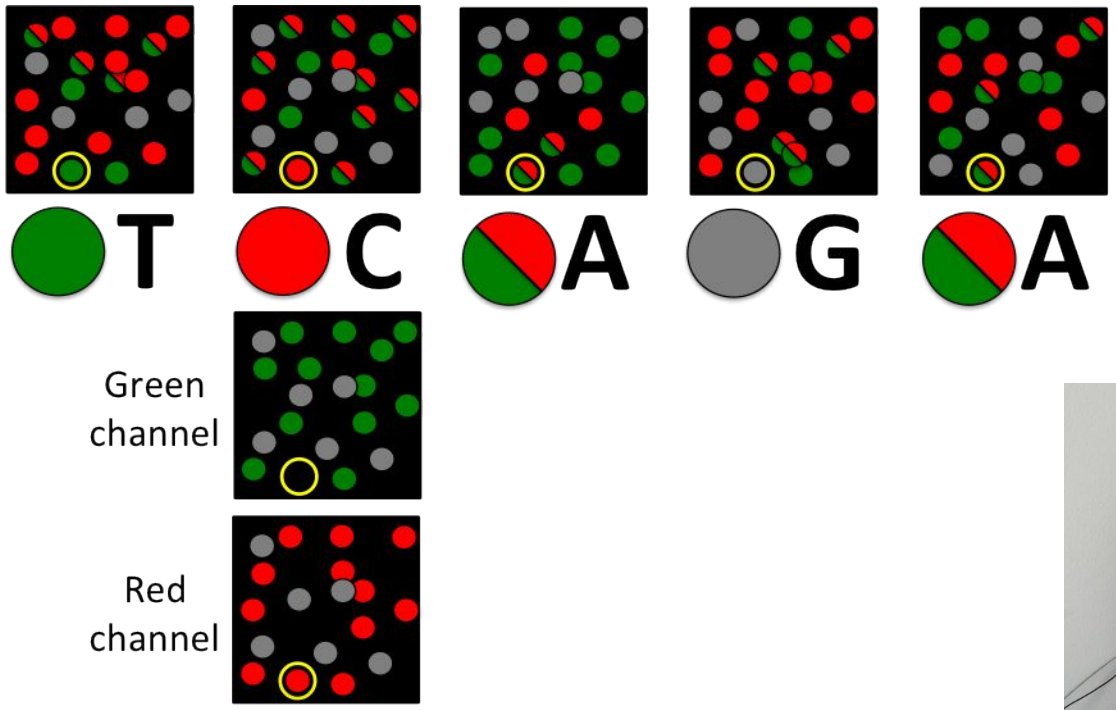
Up to eight samples can be loaded onto the flow cell for simultaneous analysis on the Illumina Genome Analyzer.

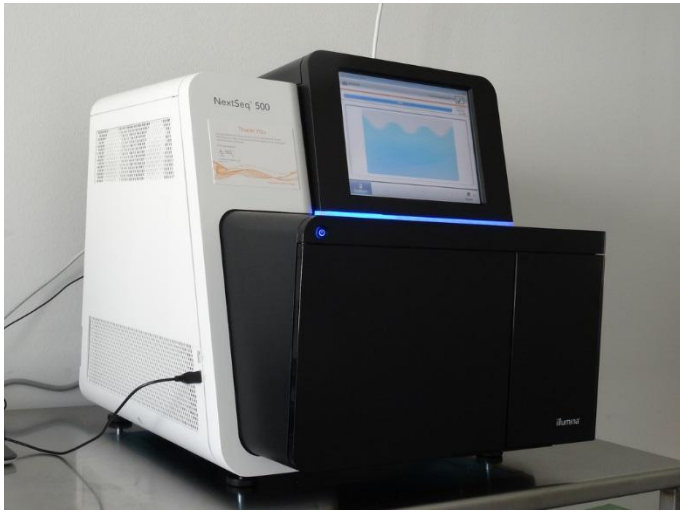






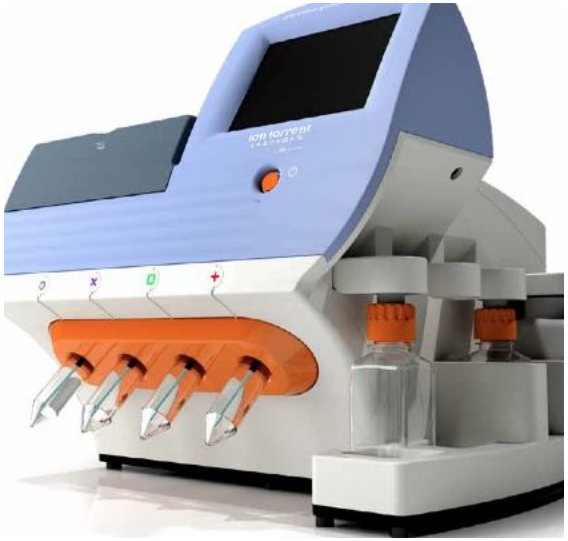
Illumina NextSeq и Nova Seq





Используются только два красителя и длины волн

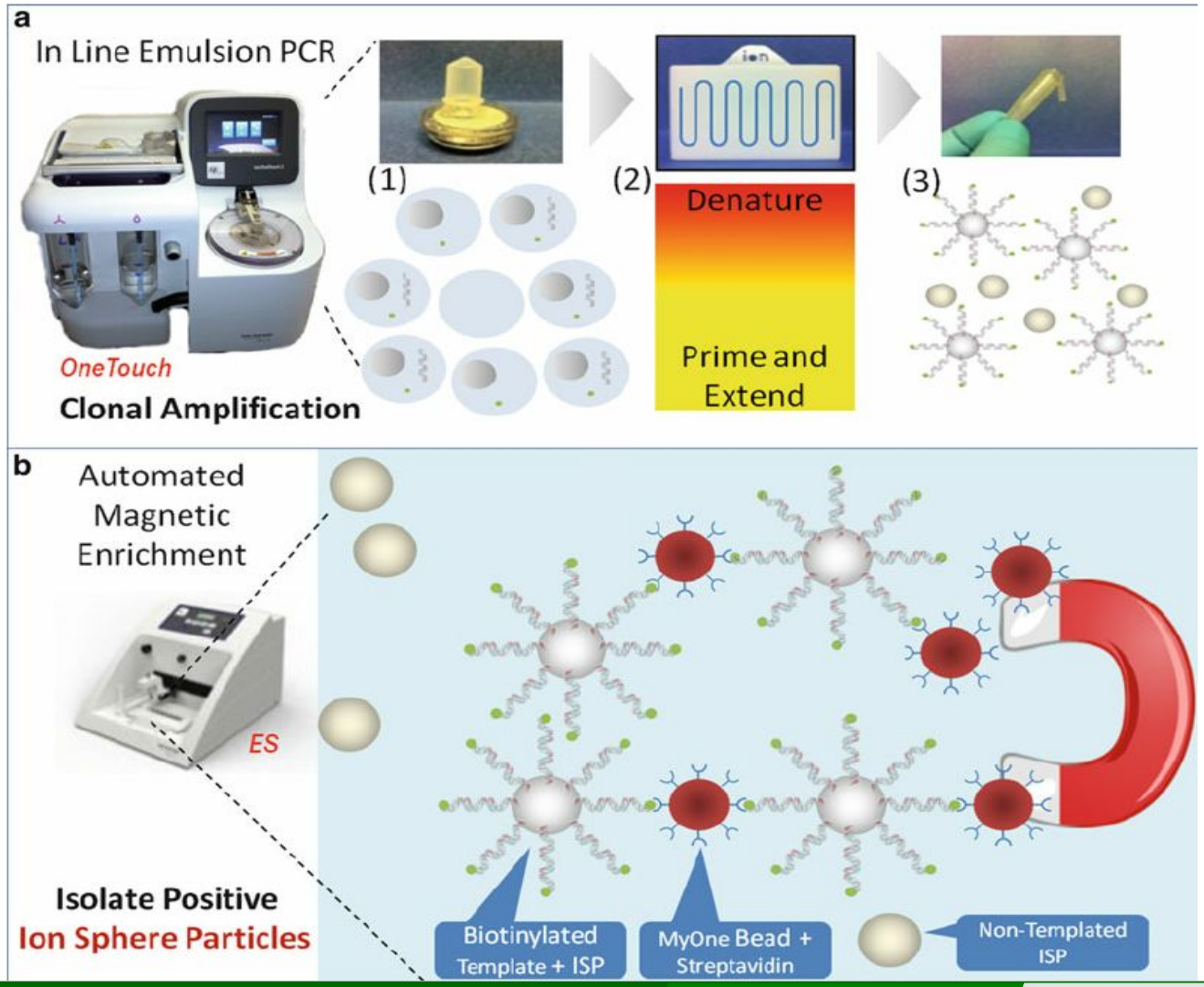
Ion \ Proton Torrent



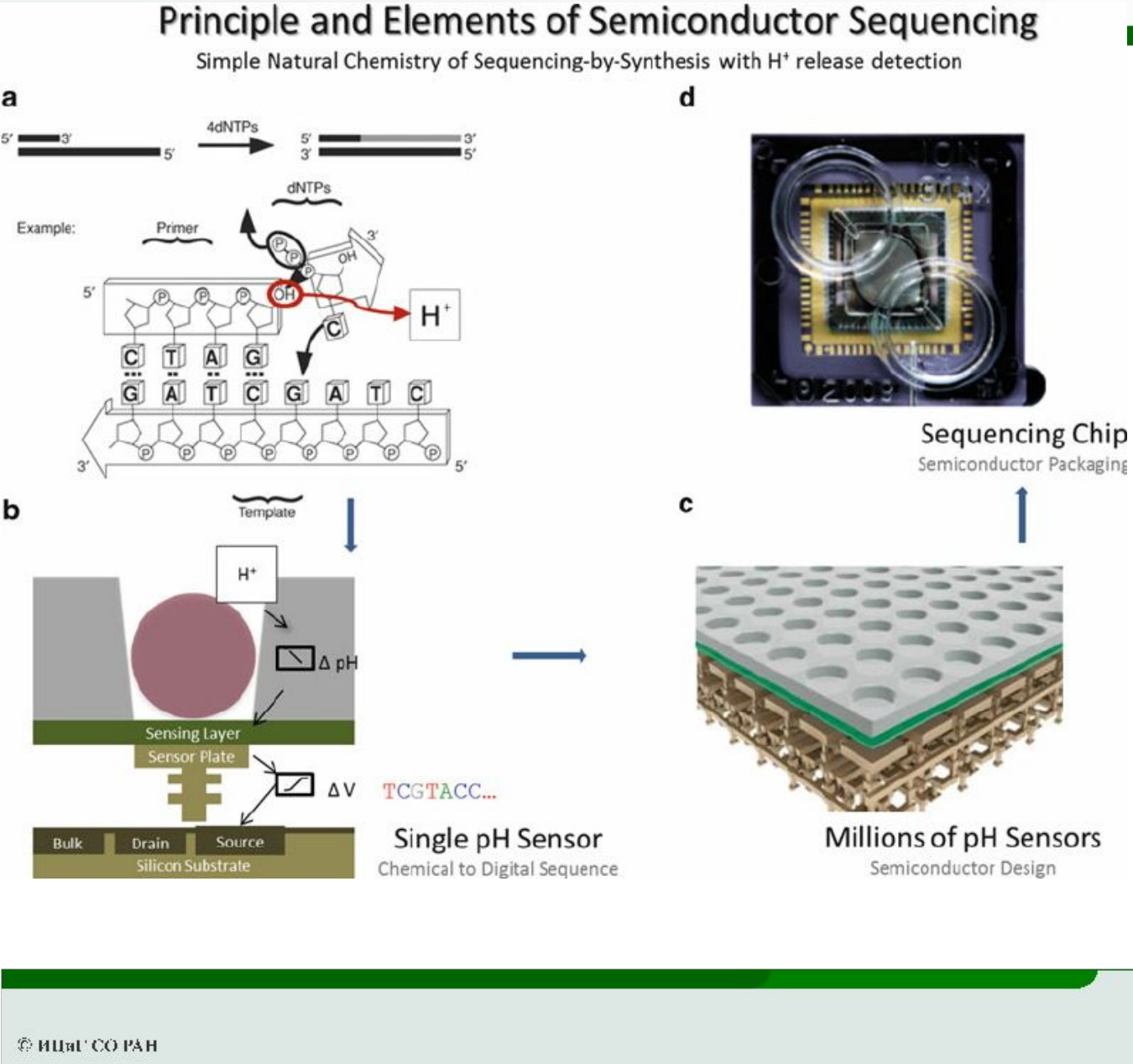
Особенности:

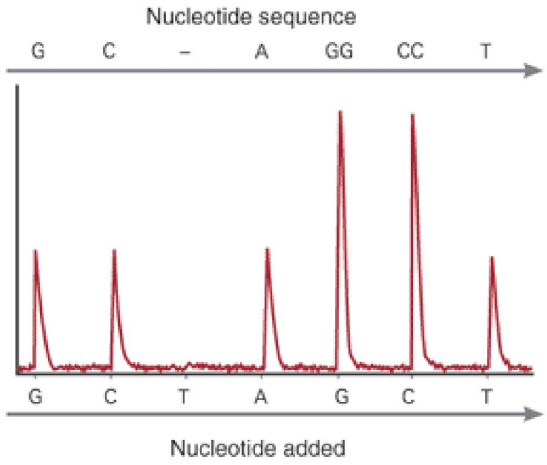
1) Не используется высокочувствительная оптика
2) Длинное чтение (до 400 п.н. непостоянной длины)
3) Самая быстрая скорость работы
4) Меньшая точность

Ion \ Proton Torrent - E-PCR

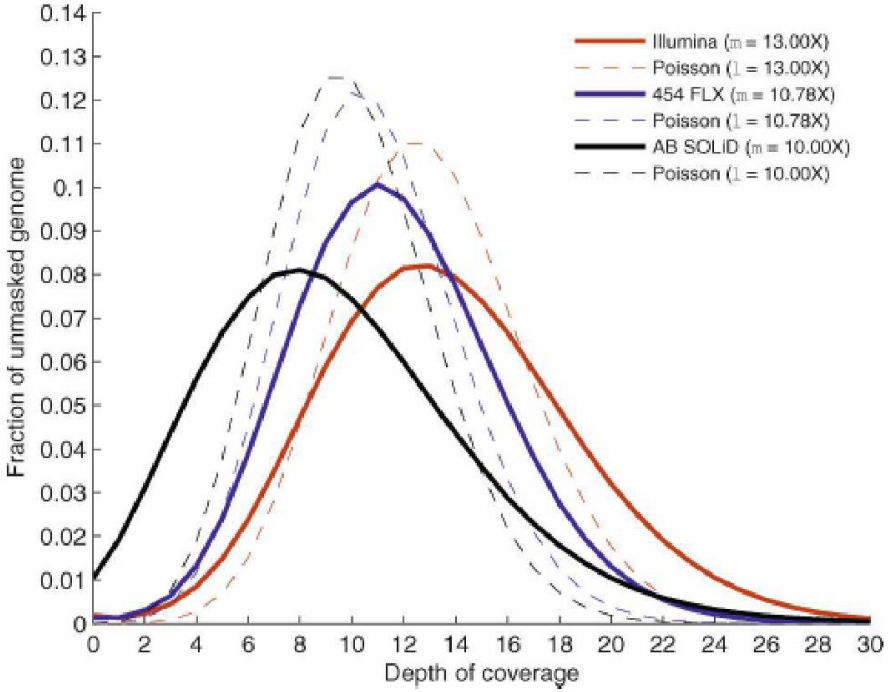


Ion \ Proton Torrent





Ошибки и проблемы NGS



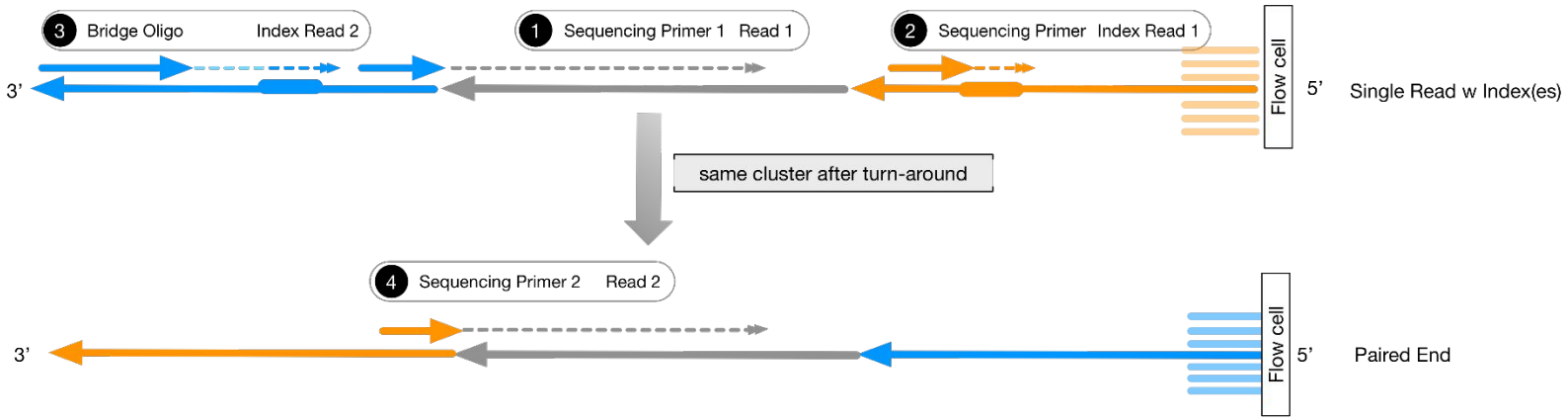
Связанные с пробоподготовкой

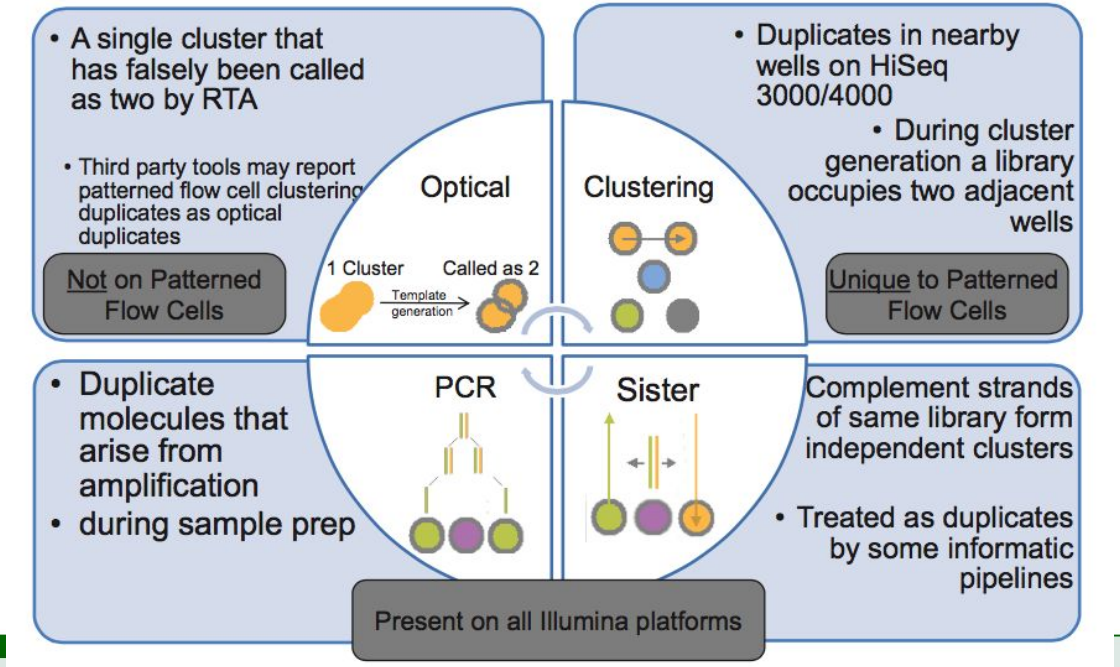
1)Искажения представленности

2)Химерные последовательности, ошибки баркодирования

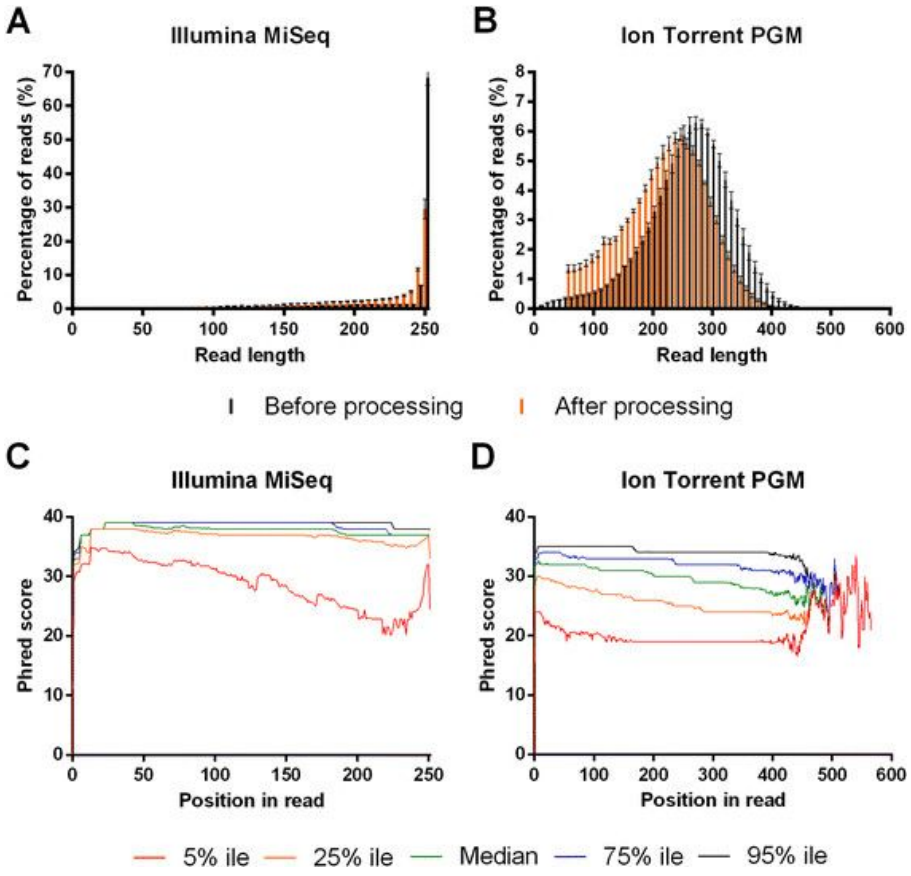
3)Фоновый шум

Ошибки кластеризации и баркодирования, поликлональность





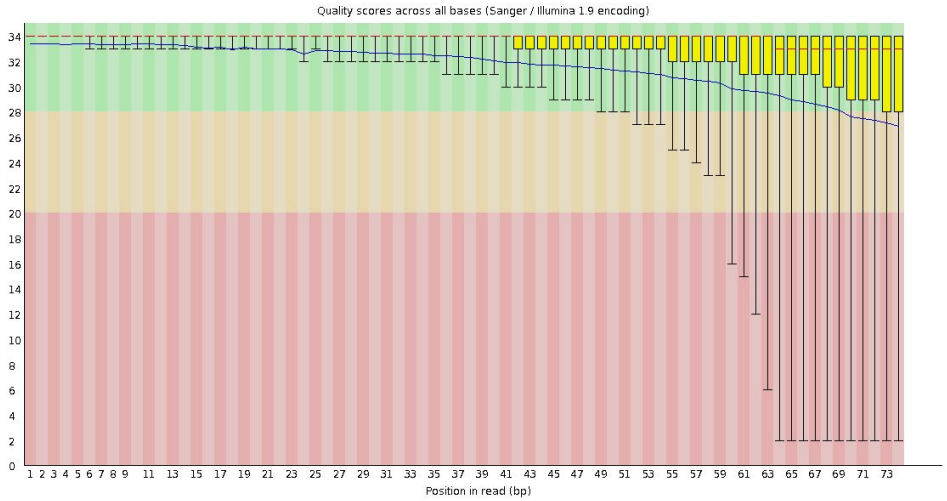
Ошибки и проблемы NGS



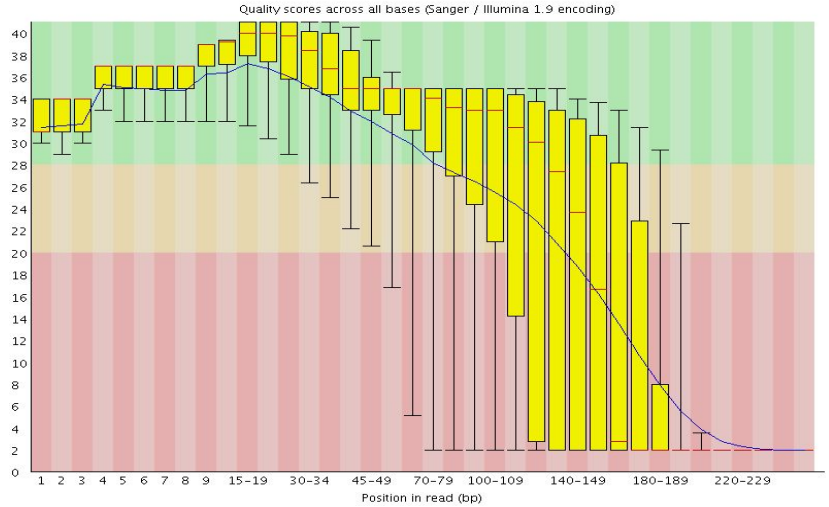
Связанные с особенностями метода

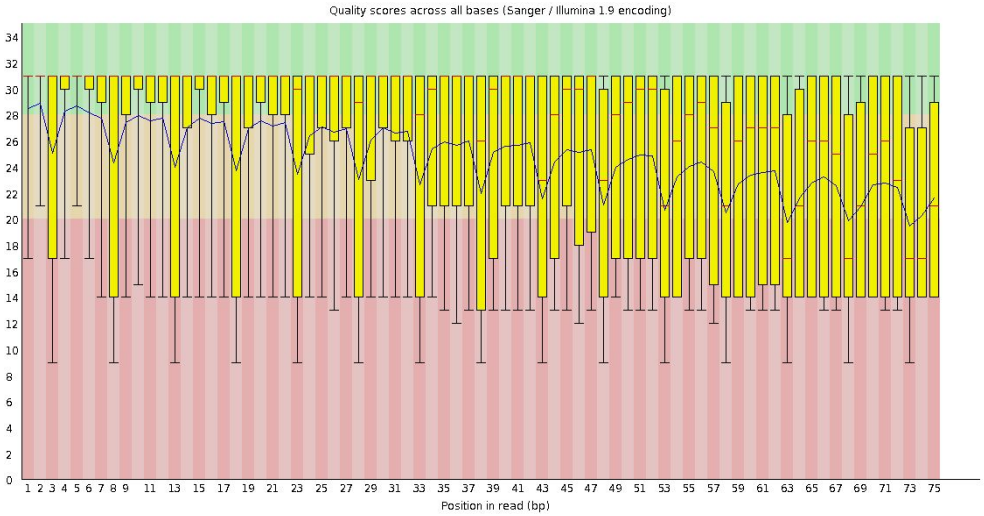
1)Искажения представленности
2)Систематические ошибки
3)Химерные контиги, ошибки анализа данных
4)Неверные алгоритмы анализа

Ошибки и проблемы NGS – анализ Q-scores

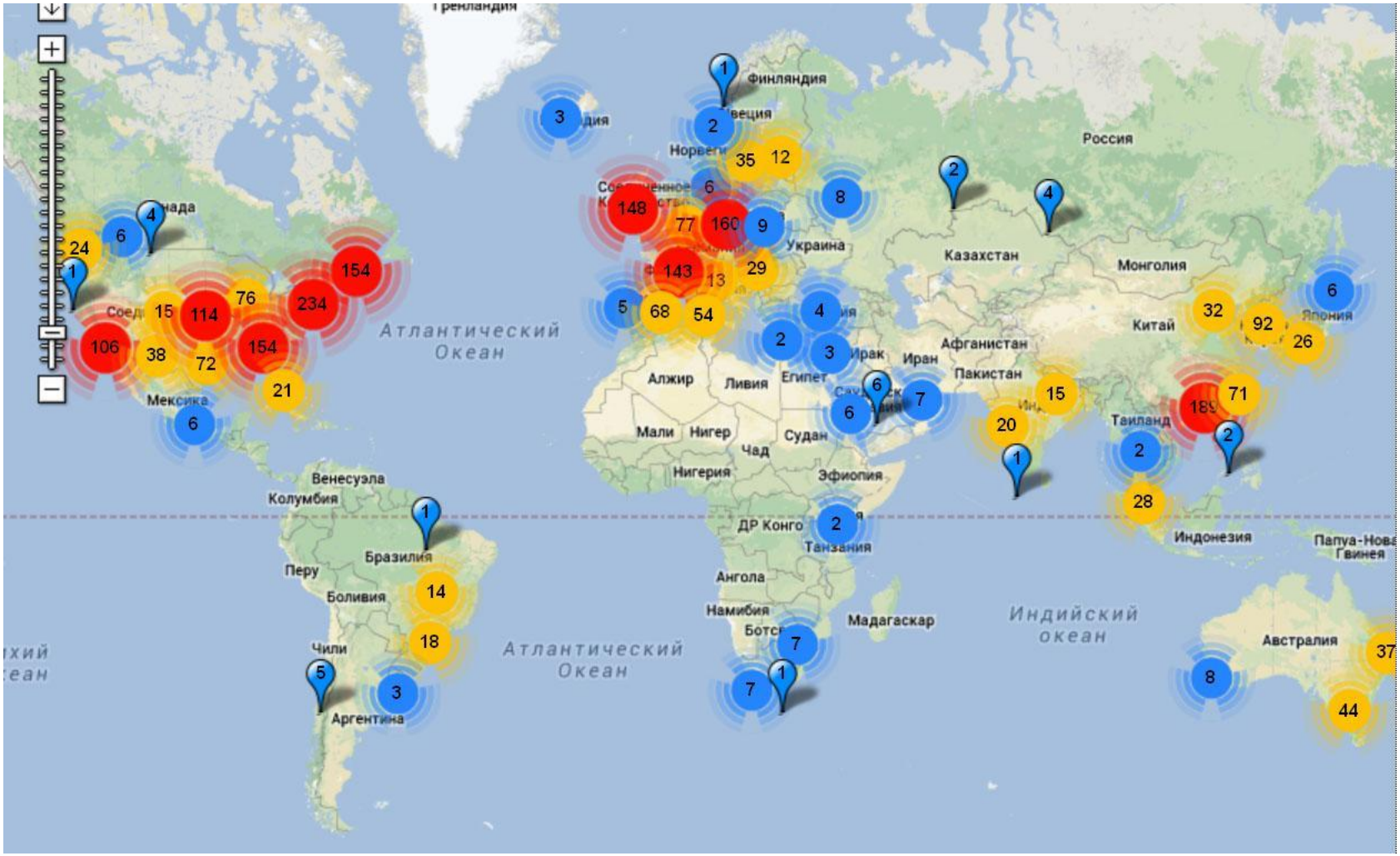


+ искажения, вносимые анализом





Мировая карта NGS систем



Спасибо за внимание