

Генетические методы типирования HLA системы методом секвенирования.

Работу выполнила
Новикова Алёна
МБХ-341 группа

- HLA типирование - исследование главного комплекса гистосовместимости человека - HLA комплекса.
- Это образование включает в себя область генов на 6-й хромосоме, которые кодируют HLA-антигены, участвующие в различных реакциях иммунного ответа.

Задачи

- Биологическая идентификация (HLA-тип наследуется вместе с родительскими генами),
- определение предрасположенности к различным заболеваниям,
- подбор доноров для пересадки органов - при этом производится сравнение результатов HLA типирования тканей донора и реципиента.
- С помощью HLA типирования определяют, и насколько супруги сходны или различимы по антигенам тканевой совместимости, чтобы диагностировать случаи бесплодия.

HLA-типирование методом секвенирования

1. По Сэнгеру
2. NGS:
 - Roche/454 Life Sciences
 - Illumina/Solexa
 - Applied Biosystems/SOLiD
 - Одномолекулярное секвенирование Helicos Biosciences
 - Одномолекулярное секвенирование в реальном времени Pacific Biosciences
 - Ion Torrent Sequencing
 - Нанопоровое секвенирование

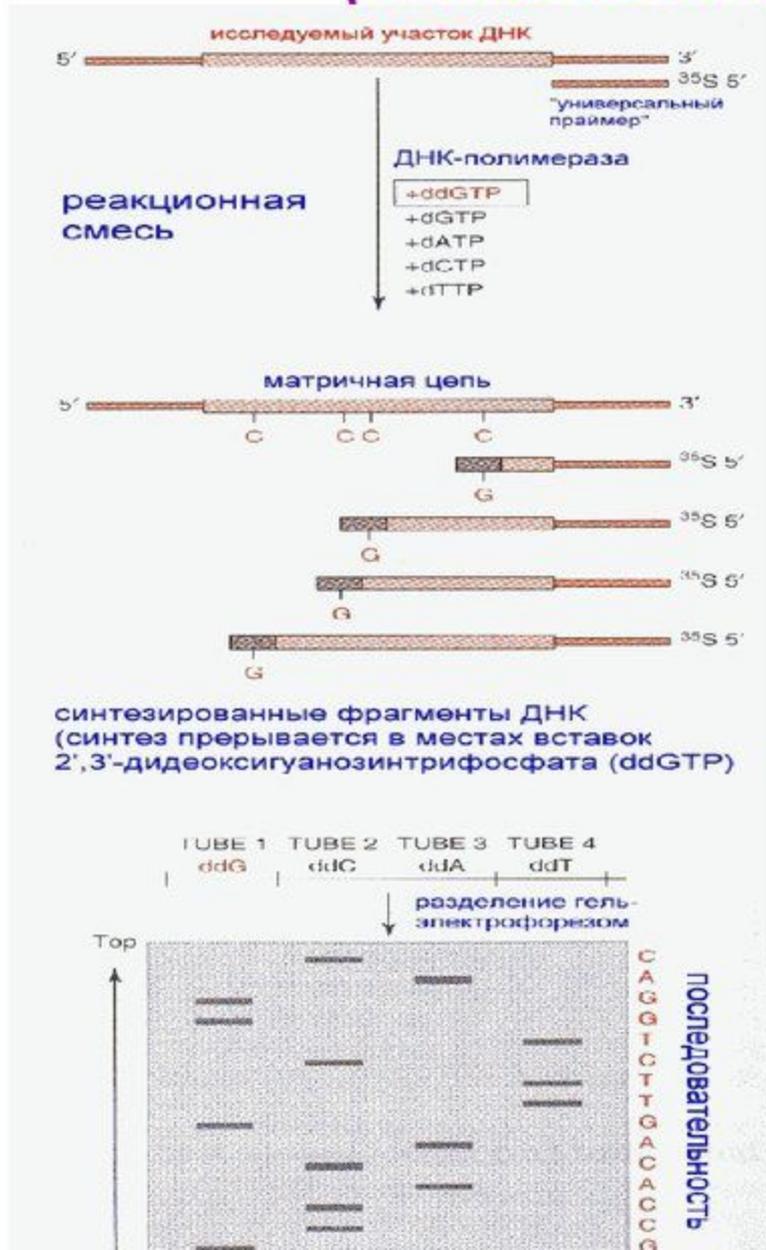
НЛА-типирование основанное на технологии секвенирования по Сэнгеру

- НЛА-секвенирование по Сэнгеру является золотым стандартом в высокоразрешающем НЛА-типировании и уже много лет успешно используется в многочисленных лабораториях.
- Метод Сэнгера — метод секвенирования (определения последовательности нуклеотидов) ДНК, также известен как метод обрыва цепи. Впервые этот метод секвенирования был предложен Фредериком Сэнгером в 1977 году, за что он был удостоен Нобелевской премии по химии в 1980 году. Данный метод был наиболее распространенным на протяжении 40 лет.

В классическом варианте метода Сэнгера одна из цепочек анализируемой ДНК выступает в качестве матрицы для синтеза комплементарной цепочки ферментом ДНК-полимеразой. Реакцию с одной и той же матрицей проводят в четырёх разных пробирках, каждая из которых содержит:

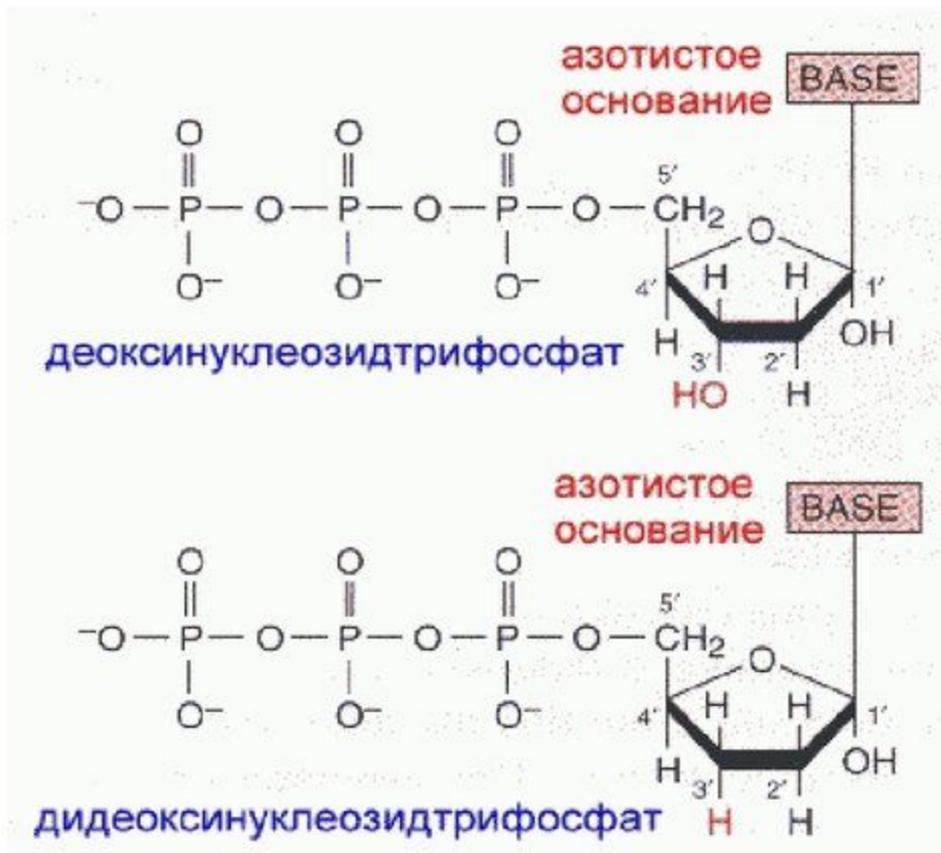
- праймер — небольшую одноцепочечную молекулу ДНК, комплементарную началу участка, который нужно отсеквенировать. Праймер необходим потому, что ДНК-полимеразы не могут начинать синтез цепи «с пустого места», они только присоединяют следующий нуклеотид к уже имеющейся 3'-гидроксильной (ОН) группе предыдущего. Праймер, таким образом, представляет собой «затравку» при синтезе ДНК;
- четыре стандартных дезоксинуклеотида (dATP, dGTP, dCTP и dTTP);
- небольшое количество (в концентрации 1 к 100) одного из радиоактивно меченных дезоксинуклеотидов (дидезоксинуклеотида) (например, [³²P]-дАТФ), который включается в состав ДНК во время синтеза и позволяет впоследствии визуализировать продукты реакции.

Секвенирование ДНК по Сэнгеру (метод полимеразного копирования)



- I. Прежде всего фрагмент ДНК клонируют в *фаге M13*, из которого легко выделяют *однонитевую ДНК*.
- II. Ее гибридизуют с короткой ДНК, называемой *праймером*, которая связывается с 3'-концом однонитевой ДНК.
- III. Затем к полученной матрице добавляют *четыре дезоксирибонуклеозидтрифосфата дНТФ (dNTP)*:
 - *dATP (dATP)*,
 - *dGTP (dGTP)*,
 - *dTTP (dTTP)*,
 - *dCTP (dCTP)*.

Секвенирование ДНК по Сэнгеру (продолжение)



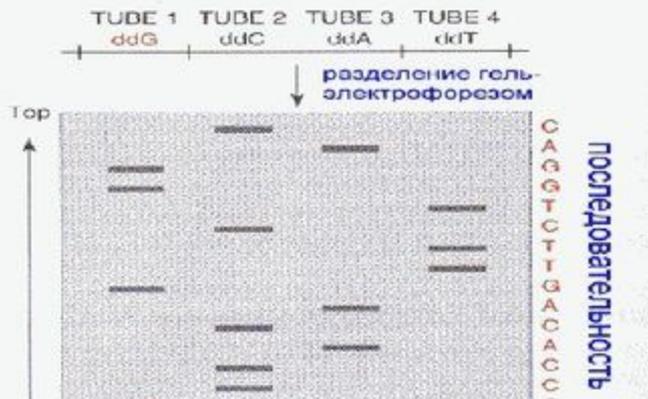
IV. Кроме *дНТФ (dNTP)* в реакционную смесь добавляют один из четырех *дидезоксирибонуклеозидтрифосфатов [ддНТФ (ddNTP)]*.

ддНТФ (ddNTP) – это полученный искусственным путем нуклеотид, лишенный *2'- и 3'-гидроксильных групп при углеродных атомах рибозы*

Секвенирование ДНК по Сэнгеру (продолжение)



синтезированные фрагменты ДНК
(синтез прерывается в местах вставок
2',3'-дидеоксигуанозинтрифосфата (ddGTP))



V. Затем с помощью ДНК-полимеразы ведут синтез второй (комплементарной) цепи ДНК.

Остановка синтеза (обрыв цепи) будет происходить всякий раз, когда вместо dNTP в растущую цепь ДНК будет встраиваться соответствующий ему ddNTP.

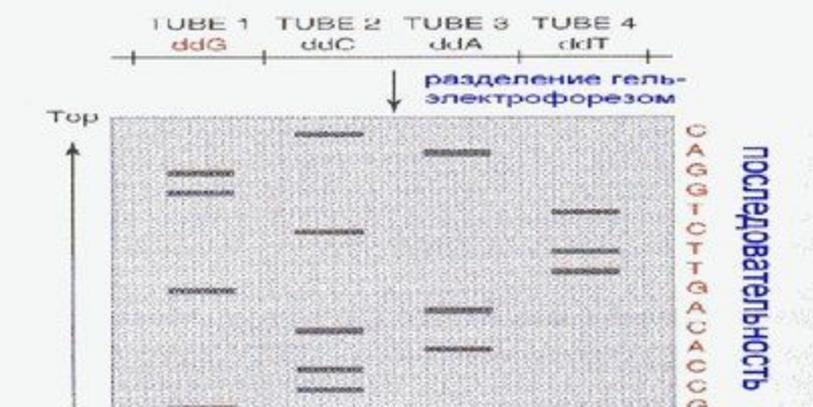
VI. Для определения последовательности нуклеотидов необходимо поставить 4 отдельные реакции в присутствии каждого из четырех ddNTP.

Соотношение концентраций dNTP и ddNTP подбирают с таким расчетом, чтобы ddNTP оказался включенным по всем позициям в смеси растущих цепей. В результате, если в пробирке содержится ddGTP, то к концу реакции в ней оказывается набор всех возможных полинуклеотидов, начинающихся с 5'-концевого нуклеотида-праймера и заканчивающихся дидезоксигуанозином (ddGTP).

Секвенирование ДНК по Сэнгеру (продолжение)



синтезированные фрагменты ДНК
(синтез прерывается в местах вставок
2',3'-дидеоксигуанозинтрифосфата (ddGTP))



VII. Затем **четыре пробы** вносят в соседние лунки пластины геля и проводят **гель-электрофорез**.

Длина пробега каждого компонента **обратно пропорциональна** длине цепи ДНК.

VIII. Как только фрагменты ДНК визуализированы, **нуклеотидную последовательность** можно прочесть прямо в геле снизу по направлению к старту в соответствие с очередностью, в которой фрагменты располагаются на отдельных «дорожках».

- На сегодняшний день секвенирование ДНК по Сэнгеру полностью автоматизировано и проводится на специальных приборах, секвенаторах.
- Использование дидезоксинуклеотидов с флуоресцентными метками с разными длинами волн испускания позволяет проводить реакцию в одной пробирке. Реакционную смесь разделяют капиллярным электрофорезом в растворе, фрагменты ДНК, выходящие из капиллярной колонки, регистрируются детектором флуоресценции.
- Результаты анализируют с помощью компьютера и представляют в виде последовательности разноцветных пиков, соответствующих четырём нуклеотидам.
- Секвенаторы такого типа могут «прочитывать» за один раз последовательности длиной 500—1000

НЛА-типирование методом секвенирования следующего поколения (NGS)

- Секвенирование нового поколения— техника определения нуклеотидной последовательности ДНК и РНК для получения формального описания её первичной структуры.
- Технология методов секвенирования нового поколения (СНП) позволяет «прочитать» единовременно сразу несколько участков генома, что является главным отличием от более ранних методов секвенирования. СНП осуществляется с помощью повторяющихся циклов удлинения цепи, индуцированного полимеразой, или многократного лигирования олигонуклеотидов.
- В ходе СНП могут генерироваться до сотен мегабайт и гигабайт нуклеотидных последовательностей за один рабочий цикл.

Основные принципы всех методов

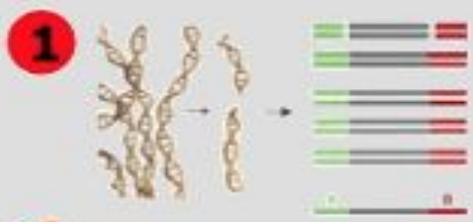
- Все основные принципы работы технологий СНП базируются на секвенировании ДНК-чипов, используя интерактивные циклические ферментативные реакции с дальнейшим сбором полученной информации в виде иллюстраций.
- Полученные данные используются для восстановления нуклеотидной последовательности или, как для технологии SOLiD, динуклеотидных «цветов».
- Несмотря на разные методы получения копий (амплификация) участков генома и на техническую разницу дифференциации различных нуклеотидов в прочтённых последовательностях, общая схема работы для всех секвенаторов одна.

Этапы

- Первый этап секвенирования — создание библиотеки случайных последовательностей ДНК, которые можно будет считать с общедоступными адаптерными последовательностями.
- Второй этап — создание ампликонов с помощью ПЦР, которые будут использованы как образцы.
- Третий этап — определение первичной структуры всех фрагментов.

Next-generation DNA sequencing

- 1** Library preparation
- 2** Clonal amplification
- 3** Cyclic array sequencing



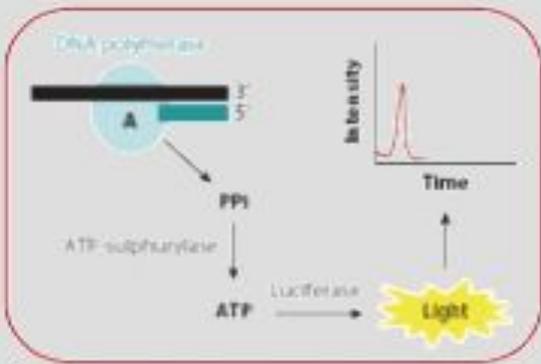
DNA fragmentation and in vitro adaptor ligation



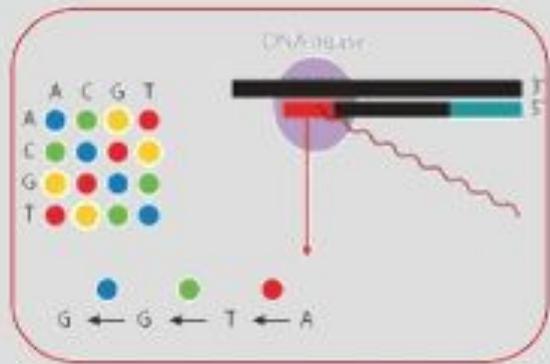
3 Pyrosequencing

Sequencing-by-ligation

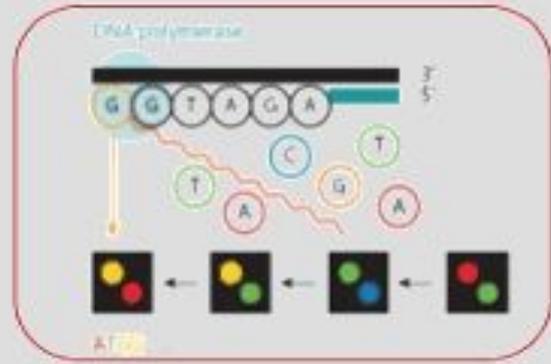
Sequencing-by-synthesis



454 sequencing



SOLiD platform



Solexa technology

Roche/454 Life Sciences

- Первая эффективно используемая на коммерческой основе платформа СНП. Компания 454 Life Sciences основана в 2000 году Джонатаном Ротбергом (в производство запущена в 2005 году). Данная технология представляет собой последовательный синтез методов эмульсионного ПЦР и пиросеквенирования.
- Амплификация ДНК проходит в каплях воды в масляной эмульсии. В каждой капле воды находится одноцепочечная матрица ДНК, связанная с праймером на бусинке. Далее, каждая бусина помещается на чип, представляющий собой оптическое волокно. Туда же помещаются необходимые для секвенирования ферменты: ДНК-полимераза, люцифераза, АТФ-сульфурилаза.
- В последней сборке реакция секвенирования идет в ячейках объемом $3,4 \cdot 10^6$ пкл, на стенках которых есть специальное металлическое покрытие, нивелирующее шум.

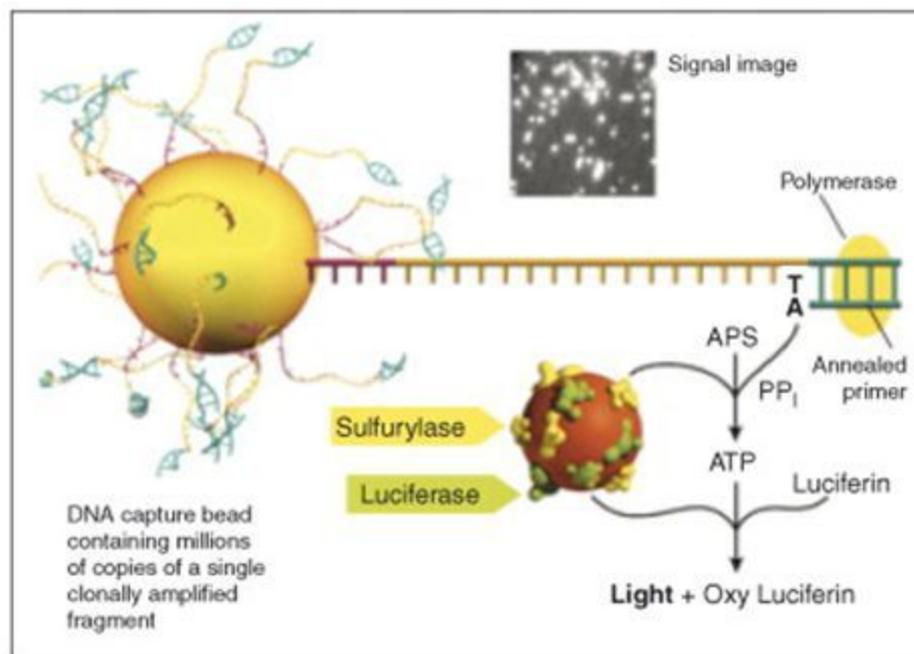
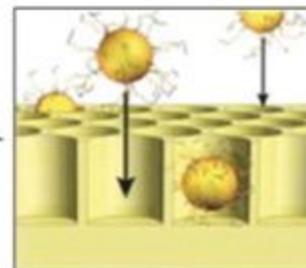
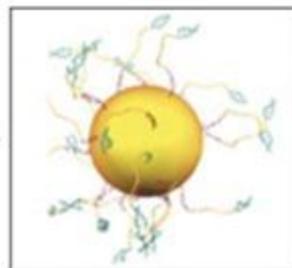
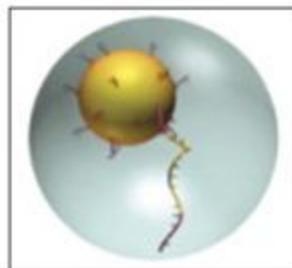
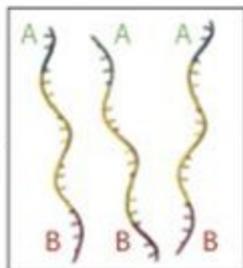
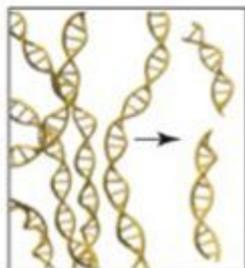
Roche 454 Sequencing

Roche (454) GSFLX Workflow:

Library construction

Emulsion PCR

PTP loading



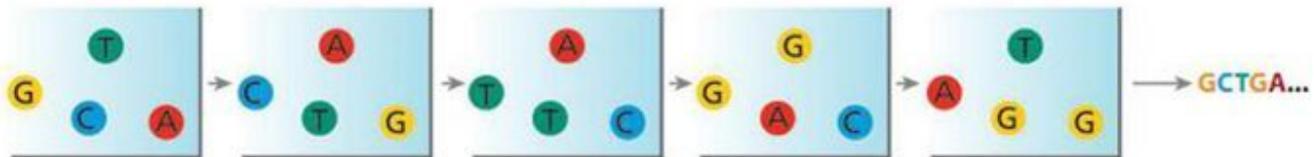
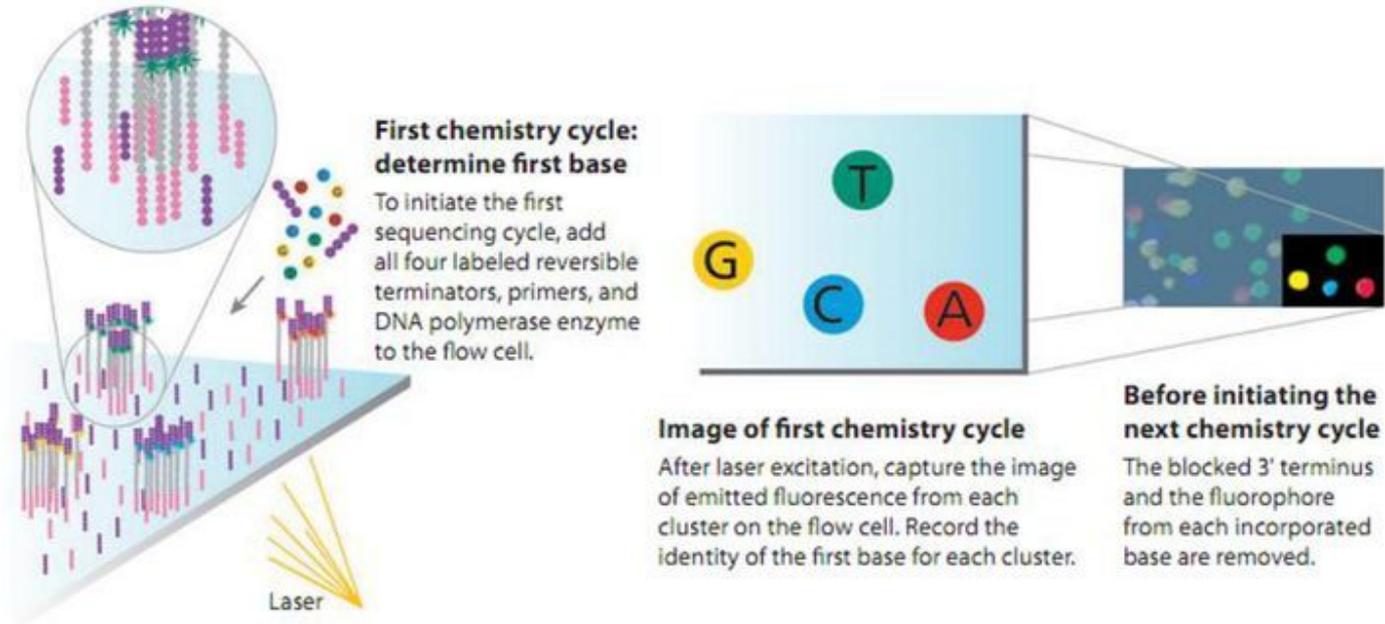
Pyrosequencing reaction

Illumina/Solexa

- Авторы метода — британские химики Шанкар Баласубраманиан и Дэвид Кленерман. Этот метод секвенирования использует прикрепленные к микросферам единичные молекулы ДНК.
- В 2006 году была запущена Solexa Genome Analyzer 1G, первая платформа, генерирующая короткие участки генома. После её приобретения компанией Illumina Genome Analyzer использует оптически прозрачные ячейки с 8 индивидуальными поверхностями, где связываются олигонуклеотиды.
- В отличие от пиросеквенирования удлинение последовательности происходит постепенно, что позволяет за раз с помощью камеры снимать большие ДНК-чипы.

Illumina/Solexa

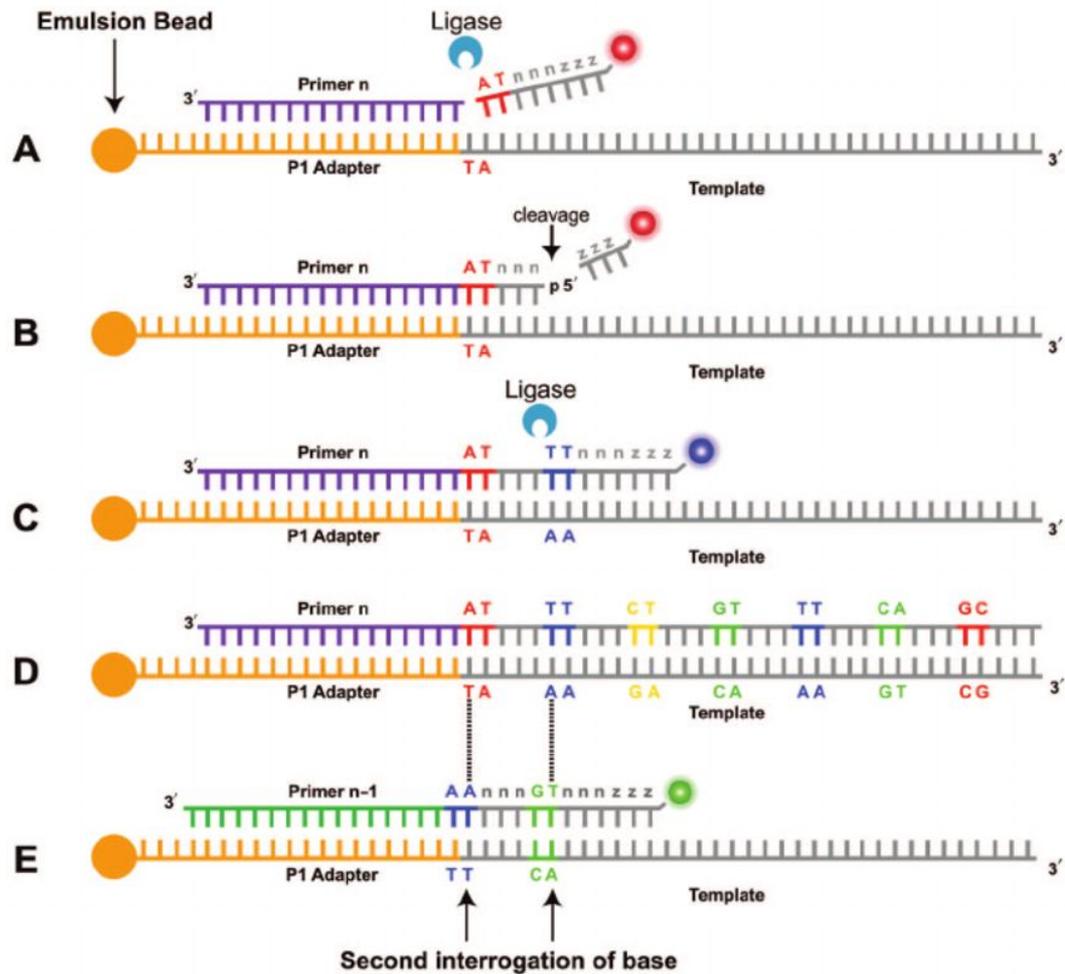
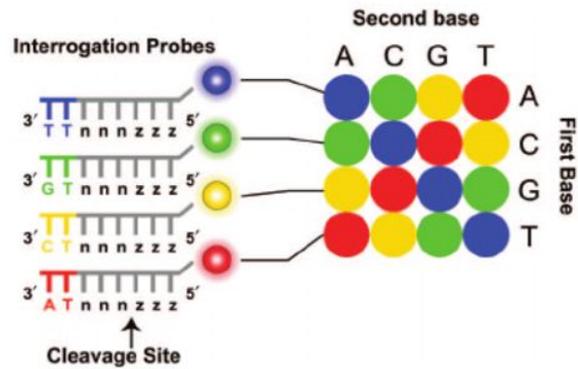
Mardis et al., 2008;



Applied Biosystems/SOLiD

- Платформа SOLiD (Supported Oligonucleotide Ligation and Detection System 2.0), разработанная Applied Biosystems — технология секвенирования коротких чтений, основанная на лигировании.
- Метод был предложен в лаборатории Георга Черча и опубликован в 2005 году (был заново просеквенирован геном *Escherichia coli*).
- По технологии SOLiD при секвенировании фрагменты ДНК лигируются на олигонуклеотидные адаптеры, прикрепленные к шарикам, далее они амплифицируются с помощью эмульсионной ПЦР.

Color-Space Coding



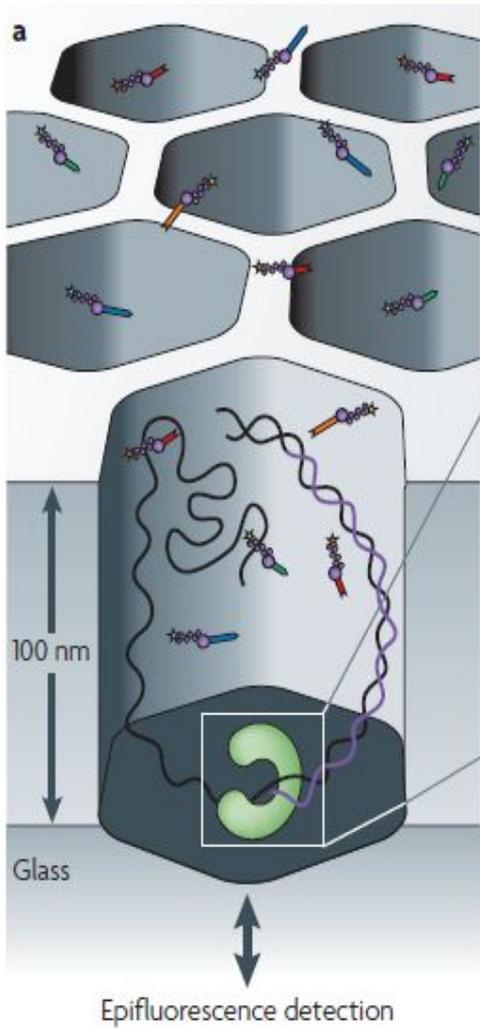
Одномолекулярное секвенирование Helicos Biosciences

- Первый метод секвенирования единичных молекул, разработанный HeliScore имеет производительность около 1Gb/день.
- Принцип работы: после клональной амплификации образца происходит фрагментация ДНК с последующим полиаденилированием на 3'-конце с дальнейшим секвенированием, чередующимся с промыванием образцов нуклеотидами с флуоресцентной меткой.

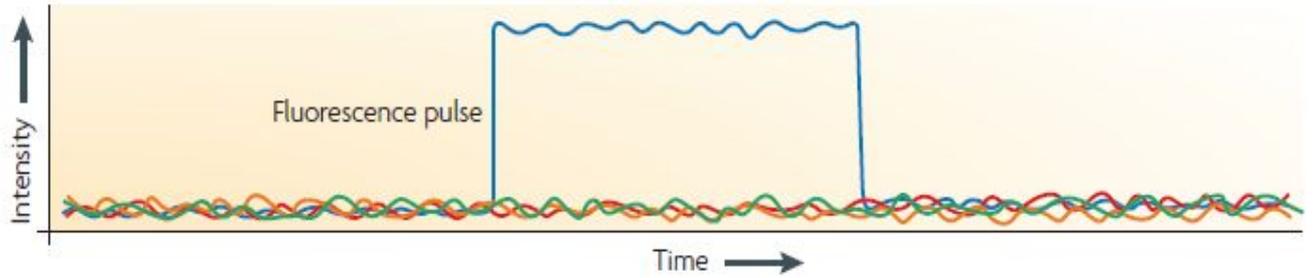
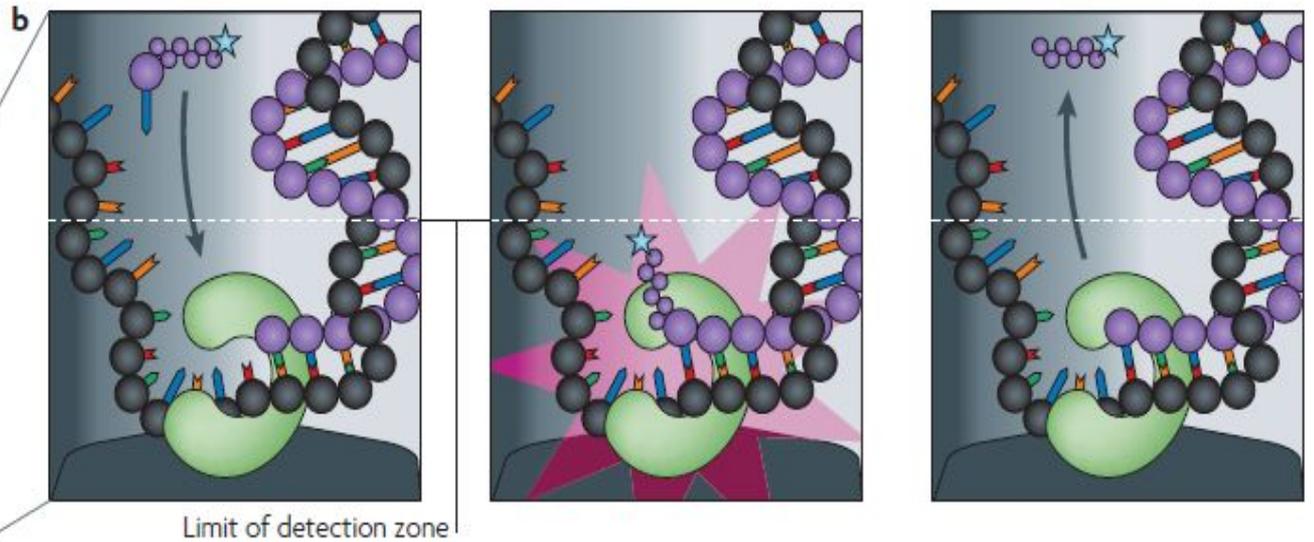
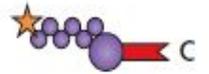
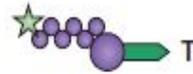
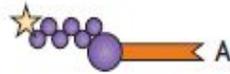
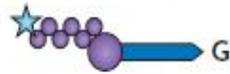
Одномолекулярное секвенирование в реальном времени Pacific Biosciences

- Метод одномолекулярного секвенирование в реальном времени (SMRT) основан на наблюдении за работой единичной молекулы ДНК-полимеразы.
- Использование четырех флуоресцентно-меченных нуклеотидов позволяет определить, какой нуклеотид присоединяет ДНК-полимераза в данный момент.

Pacific Biosciences — Real-time sequencing



Phospholinked hexaphosphate nucleotides



Ion Torrent Sequencing

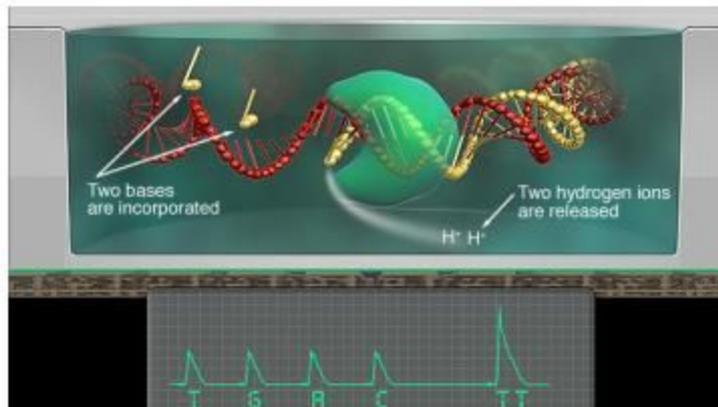
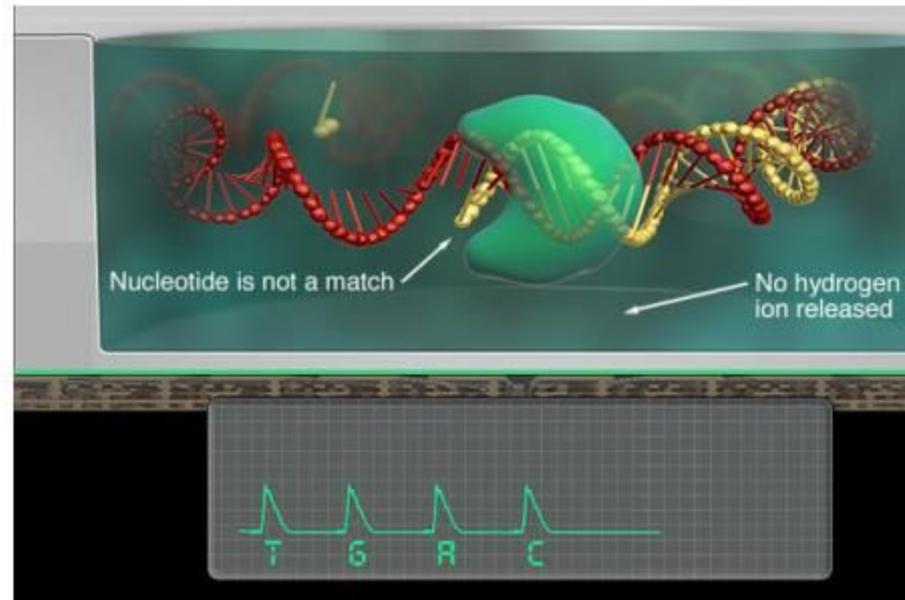
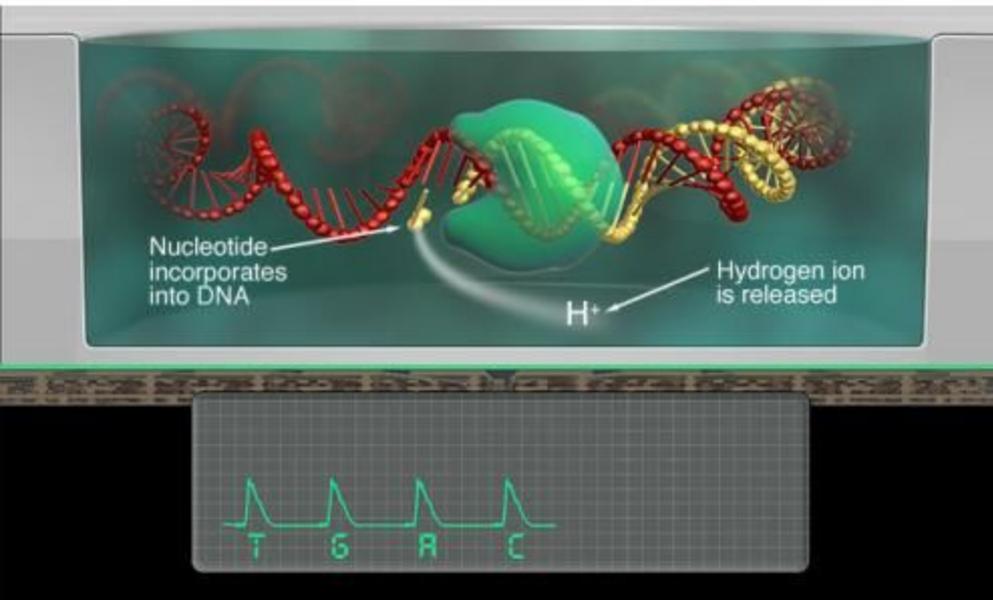
- Метод основан на связи между химической и цифровой информацией, что позволяет быстрее и проще секвенировать большое количество образцов.
- Эта технология также называется pH-индуцированным секвенированием. Процесс основан на детекции протонов, которые получаются при синтезе цепи ДНК как побочный продукт. Как следствие, pH раствора меняется, что и можно детектировать.
- Платформа Ion Torrent отличается от остальных технологий секвенирования тем, что в ней не используются модифицированные нуклеотиды и оптические методы.
- Метод Ion Torrent позволяет исследовать транскриптомы, малые РНК, проводить ChIP-seq

Ion Torrent Sequencing

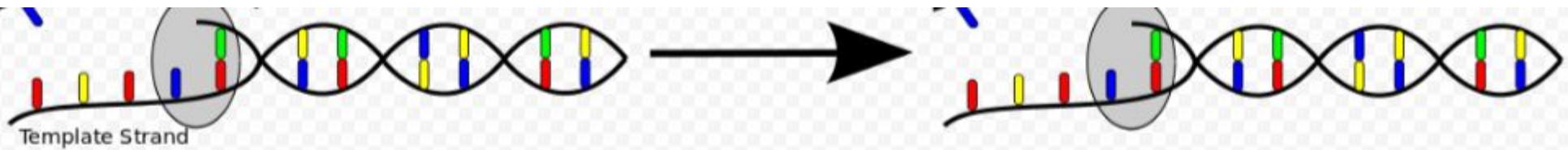
Flow one nucleotide through at a time

If nucleotide incorporates, then a current pulse is measured

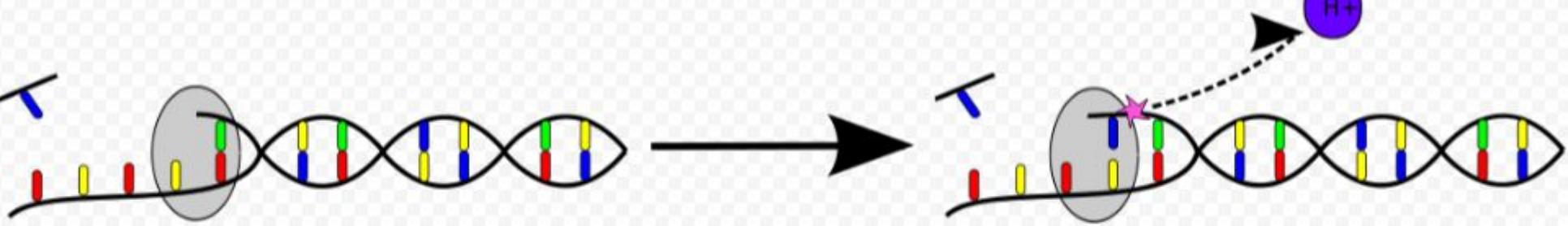
If no match, then no pulse occurs



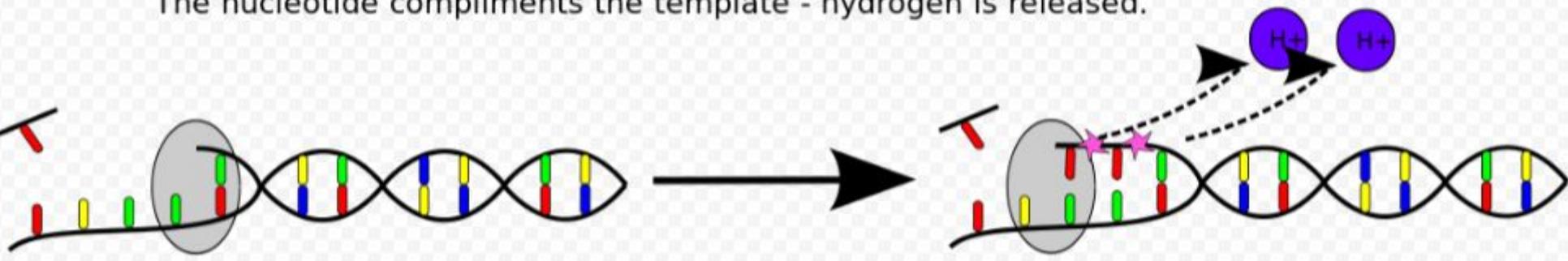
Repeated base pairs give pulse of 2x greater magnitude



The nucleotide does not compliment the template - no release of hydrogen.



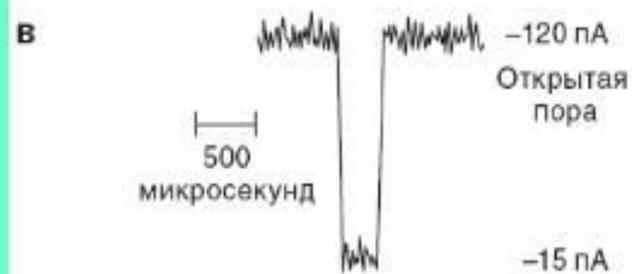
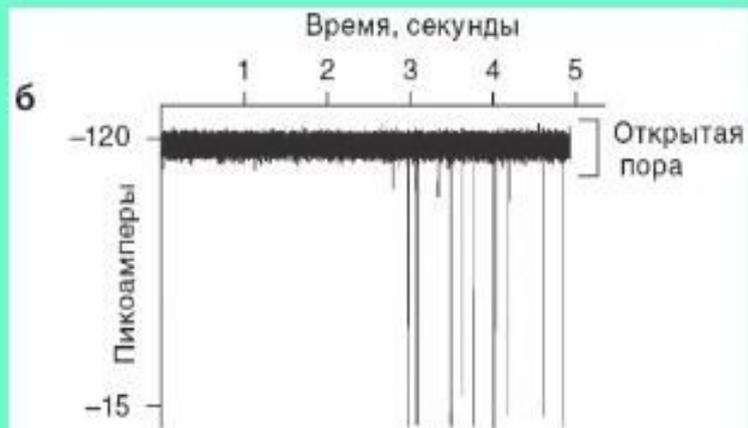
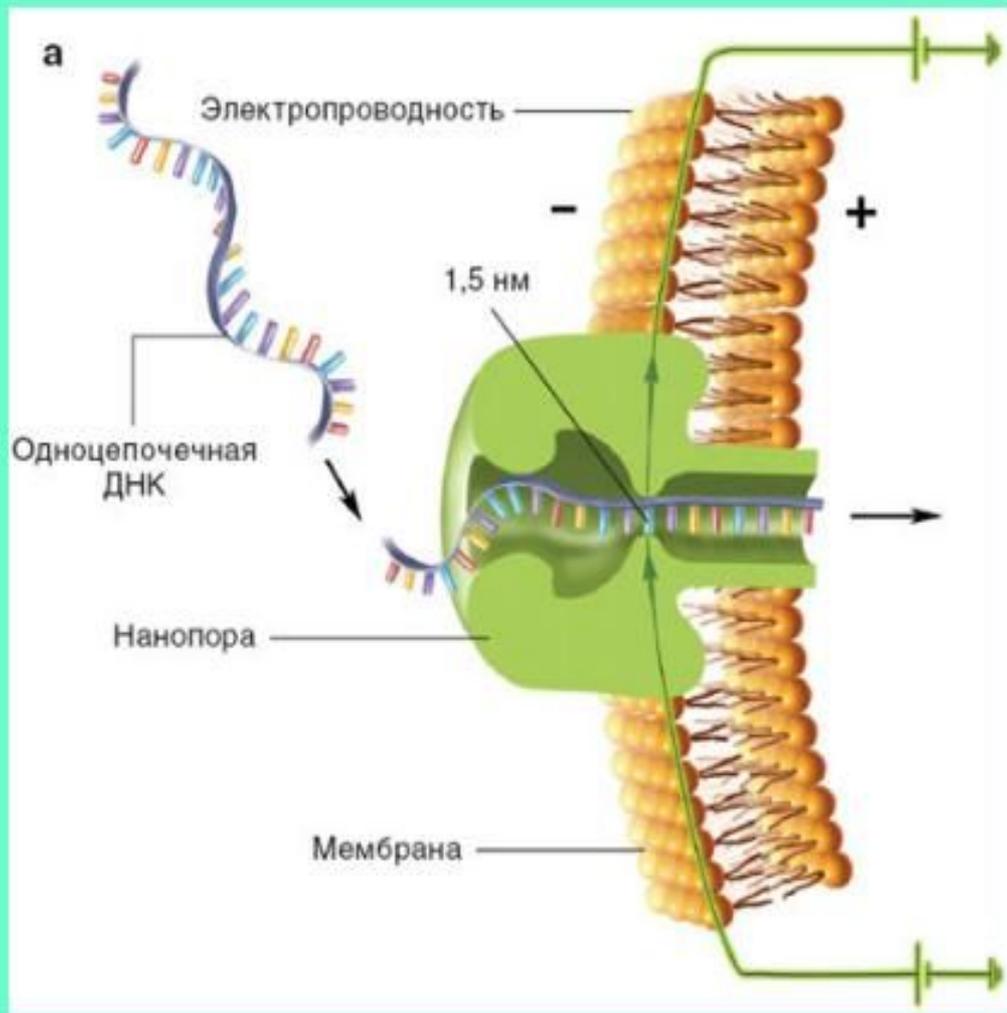
The nucleotide compliments the template - hydrogen is released.



The nucleotide compliments several bases in a row - multiple hydrogen ions are released.

Нанопоровое секвенирование

- 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.



Сравнение методов

метод	принцип	длина одного прочтения, пар оснований	стоимость секвенирования 1 млн пар оснований	стоимость секвенатора	время работы за цикл	количество прочтений за цикл	преимущества	недостатки
454 Life Sciences	пиросеквенирование	400	10\$	500 000\$	7 часов	1 000 000	длина прочтённых геномных участков; скорость	стоимость; погрешность
Illumina-SOLEXA	SBS (sequencing-by-synthesis)	300	0,05—0,15\$	600 000\$	9 дней	до 3 000 000 000	эффективность, стоимость	скорость
IonTorrent	ионный полупроводник	600	1\$	50 000\$	1,5 часа	до 5 000 000	стоимость; скорость	погрешность
SOLiD	секвенирование на основе лигирования	35—50	0,13\$	595 000\$	9 дней	1 300 000 000	стоимость	скорость
Helicos	HeliScope	2900	2\$		1 час	35 000—75 000	длина прочтённых геномных участков; скорость	низкая производительность при желаемой малой погрешности; стоимость

Спасибо за внимание