

Inżynieria genetyczna INGE7

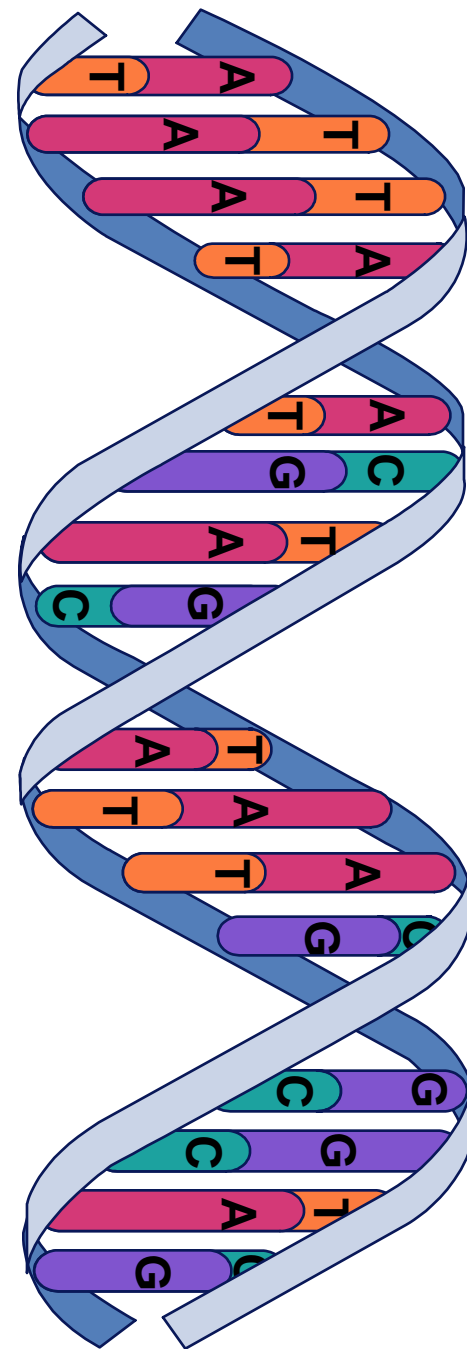
Michał Mikula

Zakład Genetyki
Centrum Onkologii-Instytut
im. Marii Skłodowskiej-Curie

email: mikula.michal@gmail.com
<http://www.ire.pw.edu.pl/~trubel/dydaktyka/inge/>

Sekwencjonowanie DNA

- ▶ **Sekwencjonowanie DNA** – proces ustalania kolejności nukleotydów tworzących cząsteczkę DNA
- ▶ **Zastosowanie:** badania podstawowe, oraz praktyczne: diagnostyka, biotechnologia, kryminalistyka, systematyka biologiczna
- ▶ Ludzkie DNA zbudowane jest z ~ 3,2 miliarda par zasad ułożonych w unikalny sposób, które przechowuje informację o ~20000 genach kodujących białka budujące organizm ludzki
- ▶ Kolejność zasad może mieć wpływ na nasze zdrowie:
 - ▶ Różna podatność na choroby i odpowiedź na lekarstwa



Sekwencjonowanie DNA – warianty genetyczne

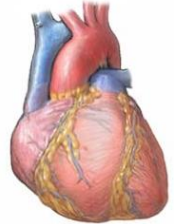
[illegible]

Sekwencjonowanie DNA – warianty genetyczne

atcgtgactgattaccaggatcctagcggatcctactgacctgacgtacgtaatgcagtggtcagggtgttcaactcgatgactagaatataccaggaaaaatccctgggaaaaattgggcc
ctacgtaccgttaacgttgcaaatcagtcggtacgtttccaggctacacacacactgacagatagacagattgtcgtgttatctgacttggaaacttaggcccttgaatctggcagtcgtaac
gtacgtacggtactgttaacgtgaggtaggtgtttcaactcatccaggaaaaatccctgggaaaaattgggccctacgtaccgttaacgttgcaaatcagtcggtacgtttccaggctacac
acacactgacagatagacagattgtcgtgttatctgacttggaaacttaggcccttgaatcttggcagtcgtaacgtacgtacgttactggtaacgtgaggtaggtgttcaactcatcgtga
ctgattaccaggatctactagaagaaaaattgggccctacgttaacgttaacgttgcaggtacgtttccaggctacacacacactgacagatagacagattgtcgtgttatctgac
ttggaaacttaggcccttgaatcttggcagtcgtaacgtacgtacgttactggtaacgtgaggtaggtgttcaactcatccaggaaaaatccctgggaaaaattgggccctacgtaccgtaa
cgttgcaaatcagtcggtacgtttccaggctacacacacactgacagatagacagattgtcgtgttatctgacttggaaacttaggcccttgaatcttggcagtcgtaacgtactagaatata
tcaggaaaaatccctgggaaaaattgggaactgttgcaaatcagtcggtacgtttccaggctacacacacactgacagatagacagattgtcgtgttatctgacttggaaacttaggcccttga
aatcttggcagtcgtaacgtacgtacgtcctacgtaccgtcggtactgtgaaactgaggtcaggtgttcaactcatccaggattagatccgtagatcgtaggaaaatctcggataaataaca
gtacacacacacttagacattaaatccctgggaaaaattggccctacgttaacgttgcaggtacgtttccaggctacacacacactgacagatagacagattgtcgt
gttatctgacttggaaacttaggcccttgaatcttggcagtcgtaacgtacgtacgttactggtaacgtgaggtaggtgttcaactcatcgtgactgattaccaggatcctagcggatccta
ctgacctgacgtacgtaatgcagtggtcagggtgttcaactcgatgactagaatataccaggaaaaatccctgggaaaaattgggccctacgtgctgaacgtacgtacgttactggtaacg
tgaggtaggtgttcaactcatccaggaaaaatccctgggaaaaattgggccctacgtaccgttaacgttgcaaatcagtcggtacgtttccaggctacacacacactgacagatagacaga
ttgtcgtgttatctgacttggaaacttaggcccttgaatcttggcagtcgtaacgtacgtttccaggctacacacacactgacagatagacagattcaaatcagtccttgaatcttggcagtc
gtaacgtacgtacgttactgttaacgtgaggtcaggtgttcaactcatcgtgactgacagattgtcgtgttatctgacttggaaacttaggcccttgaatcttggcagtcgtaacgtactagaatataccaggaaaaatccctg
gatgagaaaaattgggccctacgtaccgttaacgttgcaaatcagtcggtacgtttccaggctacacacacactgacagatagacagattgtcgtgttatctgacttggaaacttaggccctt
gaatcttggcagtcgtaacgtacgtacgttactggtaacgtgaggtaggtgttcaactcatccaggaaaaatccctgggaaaaattgggccctacgtaccgttaacgttgcaaatcagtcg
gtacgtttccaggctacacacacactgacagatagacagattgtcgtgttatctgacttggaaacttaggcccttgaatcttggcagtcgtaacgtactagaatataccaggaaaaatccctg
ggaaaaattgggccctacgtaccgttaacgttgcaaatcagtcggtacgtttccaggctacacacacactgacagatagacagattgtcgtgttatctgacttggaaacttaggcccttgaat
cttggcagtcgtaacgtacgtacgttactggtaacgtgaggtcaggtgttcatatataccaggaaaaatccctgggaaaaattggctacgtaccgttataactaggatctccgattggtaccat
taagacacccaaataggtaacaggtagacatattgataccatagaggatagattaggacgttgcaaatcagtcggtacgtttccaggctacacacacactgacagatagacagattg
tcgtgttatctgacttggaaacttaggcccttgaatcttggcagtcgtaacgtacgtacgttactggtaacgtgaggtaggtgttcaactcatccaggaaaaatccctgggaaaaattgggc
ctacgtaccgttaacgttgcaaatcagtcggtacgtttccaggctacacacacactgacagatagacagattgtcgtgttatctgacttggaaacttaggcccttgaatcttggcagtcgtaa
cgtacgtacgttactggtaacgtgaggtaggtgttcaactcatcgtgactgattaccaggatcctagcggatcctactgacctgacgtacgtaatgcagtggtcaggtgttcaactcgat
agaaaaattgggccctacgtaccgttaacgttgtagctgtacgttaccagctacacacacactgacagatagacagattgtcgtgttatctgacttggaaacttaggcccttgaatcttggcagtcga
acgtactagaatataccaggaaaaatccctgggaaaaattgggccctacgtaccgttaacgttgcaaatcagtcggtacgtttccaggctacacacacactgacagatagacagattgtcgt
gttatctgacttggaaacttaggcccttgaatcttggcagtcgtaacgtacgtacgttactggtaacgtgaggtaggtgttcaactcatccaggaaaaatccctgggaaaaattgggcccta
cgtaccgttaacgttgcaaatcagtcggtacgtttccaggctacacacacactgacagatagacagattgtcgtgttatctgacttggaaacttaggcccttgaatcttggcagtcgtaacgtac
gtacgggtactggtaacgtgaggtaggtgttcaactcatcgtgactgattaggaaaaatccctgggaaaaattgggccctacgtaccgttaacgttgcaaatcagtcggtacgtttccaggc
tacacacacactgacagatagacagattgtcgtgttatctgacttggaaacttaggcccttgaatcttggcagtcgtaacgtacgtacgttactggtaacgtgaggtaggtgttcaactcat
ccaggaaaaatccctgggaaaaattgggccctacgtaccgttaacgttgcaaatcagtcggtacgtttccaggctacacacacactgacagatagacagattgtcgtgttatctgacttggaa
ctgtaggcccttgaatcttggcagtcgtaacgtacgtacgttactggtaacgtgaggtaggtgttcaactcatcgtgactgattaccaggatcctagcggatcctactgacctgacgtacgt
aatgcagtggtcaggtgttcaactcgatgagaaaaattgggccctacgtaccgttaacgttgcaaatcagtcggtacgtttccaggctacacacacactgacagatagacagattgtcgt
ttatctgacttggaaacttaggcccttgaatcttggcagtcgtaacgtacgtacgttactggtaacgtgaggtaggtgttcaactcatccaggaaaaatccctgggaaaaattgggccctac
gtacacacacttgcaaatcagtcggtacgtttccaggctacacacacactgacagatagacagattgtcgtgttatctgacttggaaacttaggcccttgaatcttggcagtcgtaacgtac
tagaataataccaggaaaaatccctgggaaaaattgggccctacgtaccgttaacgttgcaaatcagtcggtacgtttccaggctacacacacactgacagatagacagattgtcgtgttatc
tgacttggaaacttaggcccttgaatcttggcagtcgtaacgtacgtacgttactggtaacgtgaggtaggtgttcaactcatccaggaaaaatccctgggaaaaattgggccctacgtacc
gtaacgttgcaaatcagtcggtacgtttccaggctacacacacactgacagatagacagattgtcgtgttatctgacttggaaacttaggcccttgaatcttggcagtcgtaacgtacgtac
agggtgttcaactcatccaggaaaaatccctgggaaaaattgggccctacgtaccgttaacgttgcaaatcagtcggtacgtttccaggctacacacacactgacagatagacagattgtcgt
gttatctgacttggaaacttaggcccttgaatcttggcagtcgtaacgtacgtacgttactggtaacgtgaggtaggtgttcaactcatc
ctgacctgacgtacgtaatgcagtggtcaggtgttcaactcgatgactagaatataccaggaaaaatccctgggaaaaattgggccctacgtgctgaacgtacgtacgttactggtaacg
tgaggtaggtgttcaactcatccaggaaaaatccctgggaaaaattgggccctacgtaccgttaacgttgcaaatcagtcggtacgtttccaggctacacacacactgacagatagacaga
ttgtcgtgttatctgacttggaaacttaggcgcttgaatcttggcagtcgtaacgtactagaatataccaggaaaaatccctgggaaaaattgggccctacgtaccgttaacgttgcaaatca
gtcgtgactgtttccaggctacacacacactgacagatagacagattgtcgtgttatctgacttggaaacttaggcccttgaatcttggcagtcgtaacgtacgtacgttactggtaacgtgag
gtcaggtgttcaactcatccaggaaaaatccctgggaaaaattgggccctacgtaccgttaacgttgcaaatcagtcggtacgtttccaggctacacacacactgacagatagacagattgt
cgtgttatctgacttggaaacttaggcacacacactgacagatagacagattgtcgtgttatctgacttggaaacttaggcccttgaatcttggcagtcgtaacgtacgtacgttactggtaac
gtgaggtaggtgttcaactcatccaggaaaaatccctgggaaaaattgggccctacgtaccgttaacgttgcaaatcagtcggtacgtttccaggctacacacacactgacagatagacaga
ttgtcgtgttatctgacttggaaacttaggccttgaatcttggcagtcgtaacgtactgacgttactggtaacgtgaggtacgttgaatcactcatcgtgactgattaccaggatcctagcgc
gatcctactgacctgacgtacgtaatgcagtggtcaggtgttcaactcgatgagaaaaattgggccctacgtaccgttaacgttgcaaatcagtcggtacgttactgacgtacgtacg
tacgttaacgtgaggtcaggtgttcaactcgatgactagaatataccaggaaaaatccctgggaaaaattgggccctacgtaccgttaacgttgcaaatcagtcggtacgttactgacgtacg
cagtcggtacgtttccaggctacacacacactgacagatagacagattgtcgtgttatctgacttggaaacttaggcccttgaatcttggcagtcgtaacgtacgtacgttactggtaac

Sekwencjonowanie DNA – warianty genetyczne

atcgtgactgattaccaggtacctagcggatcctactgacgtgacgtacgtaatgcagtggtcaggtgttcaactcgatgactagaatataccaggaaaaatccctgggaaaaattggcc
ctacgtaccgttaacgttgcaaatcagtcggtacgtttccaggctacacacacactgacagatagacagattgctgttattctgacttgaacttaggcccttgaatctggcagtcgtaac
gtacgtacgtgactgttaacgtgaggtcaggtgttcaactcatccaggaaaaatccctgggaaaaattggccctacgtacgttaacgttgcaaatcagtcggtacgtttccaggctacac
acacactgacagatagacagattgctgttattctgacttgaacttaggcccttgaatctggcagtcgtaacgtacgtgactggaactgaggtcaggtgttcaactcatcgtga
ctgattaccaggtactactagaagaaaaattggccctacgttaacgttgcaaatcagtcggtacgtttccaggctacacacacactgacagatagacagattgctgttattctgac
ttggaacttaggcccttgaatctggcagtcgtaacgtacgtggtactgttaacgtgaggtcaggtgttcaactcatccaggaaaaatccctgggaaaaattggccctacgtaccgtaa
cgttgcaaatcagtcggtacgtttccaggctacacacacactgacagatagacagattgctgttattctgacttgaacttaggcccttgaatctggcagtcgtaacgtactagaata
tcaggaaaaatccctgggaaaaattgggaactgttgcaaatcagtcggtacgtttccaggctacacacacactgacagatagacagattgctgttattctgacttgaacttaggcccttga
aatctggcagtcgtaacgtacgtgacctacgtacgtggtactgtgaactgaggtcaggtgttcaactcatccaggattagatccgtagatcgtaggaaaatctcggataaataaca
caccacacacttagaccatttaaatccctgggaaaaattggccctacgttaacgttgcaaatcagtcggtacgtttccaggctacacacacactgacagatagacagattgctgt
gttattctgacttgaacttaggcccttgaatctggcagtcgtaacgtacgtgactggaactgaggtcaggtgttcaactcatcgtgactgattaccaggtacctagcggatccta
ctgacctgaactcatcctacgtgactgactagaatataccaggaaaaatccctgggaaaaattggccctacgtgctgaactgacgtacgtgactggaactgaggtcag
tgaggtcaggtgaacttaggccctacgtacgttaacgttgcaaatcagtcggtacgtttccaggctacacacacactgacagatagacagattgctgttattctgact
ttgtcgtgtgtaacgtacgtttccaggctacacacacactgacagatagacagattcgaatcagtccttgaatctggcagtcgtaacgtacgtgactggaacttaggcccttga
gtacgtacgtgactggaacttaggccctacgtacgtgactggaacttaggcccttgaatctggcagtcgtaacgtacgtgactggaacttaggcccttgaatctggcagtcgtaacgtacgtgactggaacttaggcccttga
gtacgtacgtgactggaacttaggccctacgtacgtgactggaacttaggcccttgaatctggcagtcgtaacgtacgtgactggaacttaggcccttgaatctggcagtcgtaacgtacgtgactggaacttaggcccttga
taagacacccaaataggttaacaggtagacatattgataccataga
tctgttattctgacttgaacttaggcccttgaatctggcagtcgtaacgtacgtgactggaacttaggcccttgaatctggcagtcgtaacgtacgtgactggaacttaggcccttga
cctacgtacgttaacgttgcaaatcagtcggtacgtttccaggctaca
cgtacgtacgtgactggaactgaggtcaggtgttcaactcatcgtg
agaaaaaattggccctacgtacgttaacgttgactgttcaactcatcacacacactgacagatagacagattgctgttattctgacttgaacttaggcccttgaatctggcagtcgta
acgtactagaatataccaggaaaaatccctgggaaaaattggccctacgtacgttaacgttgcaaatcagtcggtacgtttccaggctacacacacactgacagatagacagattgctgt
gttattctgacttgaacttaggcccttgaatctggcagtcgtaacgtacgtgactggaacttaggcccttgaatctggcagtcgtaacgtacgtgactggaacttaggcccttgaatctggcagtcgtaacgtacgtgactggaacttaggcccttga
cgtaccgttaacgttgcaaatcagtcggtacgtttccaggctacacacacactgacagatagacagattgctgttattctgacttgaacttaggcccttgaatctggcagtcgtaacgtacgtgactggaacttaggcccttga
gtacgggtactggaactgaggtcaggtgttcaactcatcgtgactgattaggaataatccctgggaaaaattggccctacgtacgttaacgttgcaaatcagtcggtacgtttccaggc
tacacacacactgacagatagacagattgctgttattctgacttgaacttaggcccttgaatctggcagtcgtaacgtacgtgactggaacttaggcccttgaatctggcagtcgtaacgtacgtgactggaacttaggcccttga
ccaggaaaaatccctgggaaaaattggccctacgtacgttaacgttgcaaatcagtcggtacgtttccaggctacacacacactgacagatagacagattgctgttattctgacttgaacttaggcccttga
ctgtaggcccttgaatctggcagtcgtaacgtacgtacgtgactggaacttaggcccttgaatctggcagtcgtaacgtacgtgactggaacttaggcccttgaatctggcagtcgtaacgtacgtgactggaacttaggcccttga
aatgagtcggtcaggtgttcaactcgatgagaaaaattggccctacgtacgttaacgttgcaaatcagtcggtacgtttccaggctacacacacactgacagatagacagattgctgt
ttattctgacttgaacttaggcccttgaatctggcagtcgtaacgtacgtacgtgactggaacttaggcccttgaatctggcagtcgtaacgtacgtgactggaacttaggcccttgaatctggcagtcgtaacgtacgtgactggaacttaggcccttga
gtaccgttaacgttagaataat
tgacttggaa
gtaacgttg
aggtgttca
gttatctgac
ctgacctgac
tgaggtcag
ttgtcgtgtt
gtcgtgactgttccaggctacacacacactgacagatagacagattgctgttattctgacttgaacttaggcccttgaatctggcagtcgtaacgtacgtgactggaacttaggcccttgaatctggcagtcgtaacgtacgtgactggaacttaggcccttga
gtcaggtgttcaactcatccaggaaaaatccctgggaaaaattggccctacgtacgttaacgttgcaaatcagtcggtacgtttccaggctacacacacactgacagatagacagattgctgttattctgacttgaacttaggcccttga
cgtgttattctgacttgaacttagggacacacacactgacagatagacagattgctgttattctgacttgaacttaggcccttgaatctggcagtcgtaacgtacgtgactggaacttaggcccttgaatctggcagtcgtaacgtacgtgactggaacttaggcccttga
gtgaggtcaggtgttcaactcatccaggaaaaatccctgggaaaaattggccctacgtacgttaacgttgcaaatcagtcggtacgtttccaggctacacacacactgacagatagacagattgctgttattctgacttgaacttaggcccttga
ttgtcgtgttattctgacttgaacttaggcccttgaatctggcagtcgtaacgtacgtgactggaacttaggcccttgaatctggcagtcgtaacgtacgtgactggaacttaggcccttgaatctggcagtcgtaacgtacgtgactggaacttaggcccttga
gatcctactgacctgacgtacgttaacgtggtcaggtgttcaactcgatgagaaaaattggccctacgtacgttaacgttgcaaatcagtcggtacgtttccaggctacacacacactgacagatagacagattgctgttattctgacttgaacttaggcccttga
tactgtaacgtggtcaggtgttcaactcgatgactgacataatccaggaaaaatccctgggaaaaattggccctacgtacgttaacgttgcaaatcagtcggtacgtttccaggctacacacacactgacagatagacagattgctgttattctgacttgaacttaggcccttga
cagtcggtacgtttccaggctacacacacactgacagatagacagattgctgttattctgacttgaacttaggcccttgaatctggcagtcgtaacgtacgtgactggaacttaggcccttgaatctggcagtcgtaacgtacgtgactggaacttaggcccttga



- Sekwencja jest „polimorficzna” czyli zawiera warianty nukleotydów
- Występują średnio co 300pz
- Szacuje się, że w genomie człowieka jest ich 10 milionów
 - mogą mieć determinować pewne cechy fenotypowe - **kolor włosów i oczu**
 - lub mieć znaczenie medyczne – **metabolizm leków**

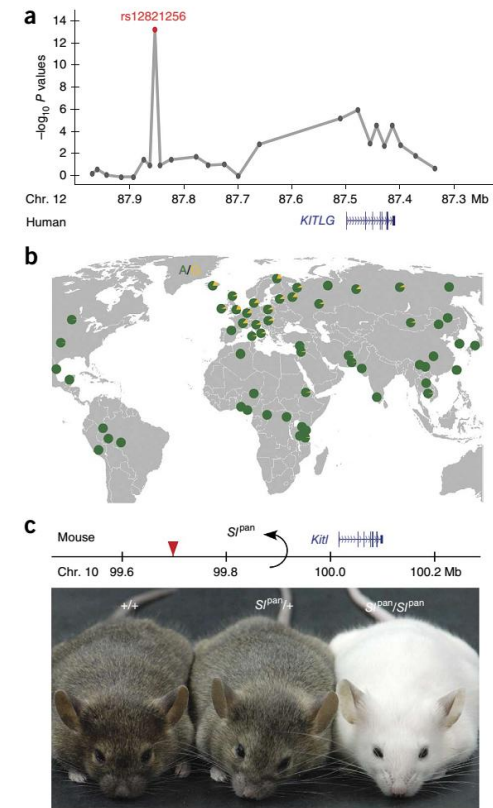
Sekwencjonowanie DNA – warianty genetyczne - przykłady

► **Polimorfizm pojedynczego nukleotydu (ang. single nucleotide polymorphism SNP)** w rejonie wzmacniacza (ang. enhancer) genu **KITLG** zmienia pigmentację włosów

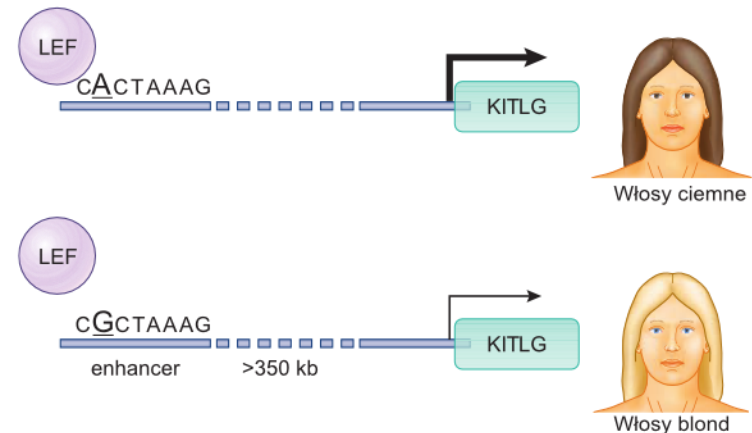
► Wariant **G** asocjujący z kolorem blond występuje częściej w populacjach Europy północnej

► Myszy pozbawione rejonu regulatorowego ze wzmacniaczem wykazują obniżoną pigmentację

► Rejon wzmacniacza wiąże czynnik transkrypcyjny LEF, który dla wariantu G wiąże się z mniejszym powinowactwem do DNA co skutkuje obniżeniem ekspresji KITLG i intensywności pigmentacji



[Nat Genet.](#) 2014 Jul;46(7):748-52.

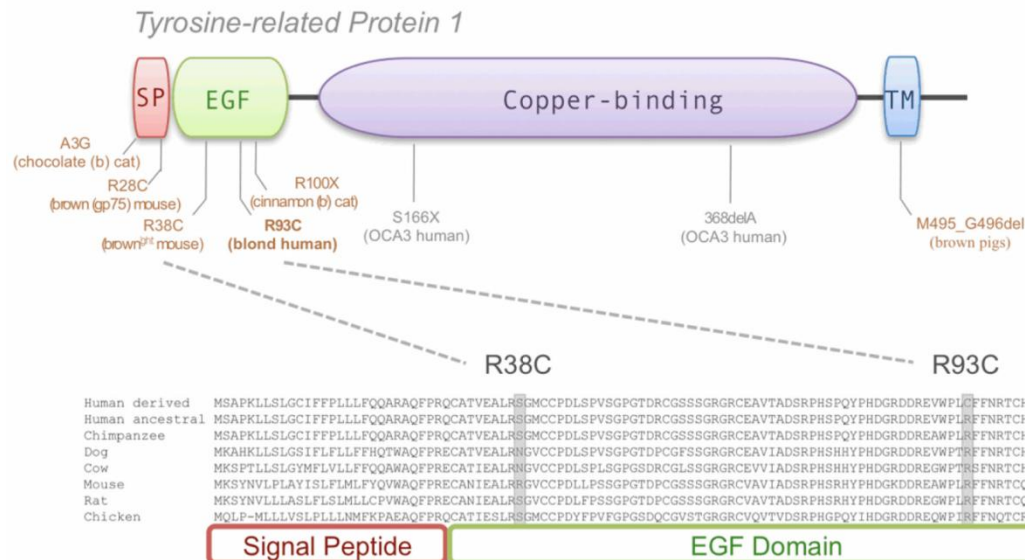


Sekwencjonowanie DNA – warianty genetyczne - przykłady

- **Mutacja** genu **TYRP1** u populacji zamieszkującej wyspy Salomona zmienia pigmentację włosów
- Mutacje w genie **TYRP1** rozjaśniają skórę i pigmentację u wielu zwierząt, a delecja genu wywołuje albinizm u człowieka
- Wariant T zmienia aminokwas w białku – Arginina na Cysteinę - R93C



http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/0/05/Blonde_girl_Vanuatu.jpg



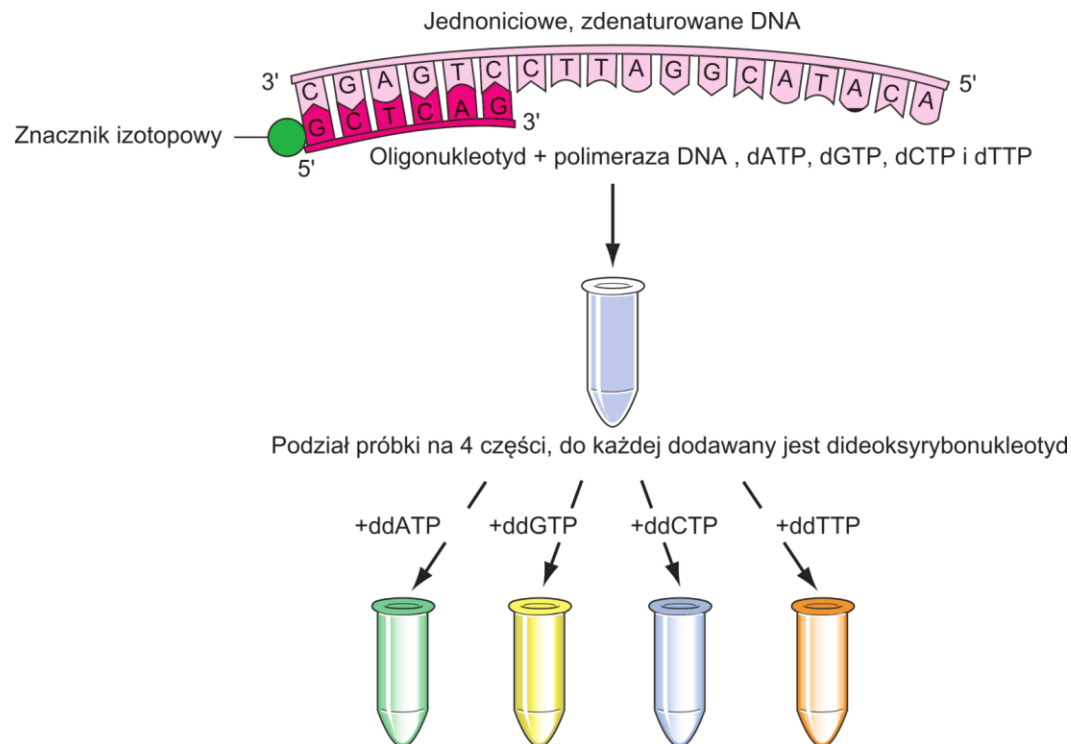
Sekwencjonowanie DNA

► Metoda Sangera

► Metoda terminacji łańcucha – pierwsza generacja

► Zasada działania

► Matryca DNA jest denaturowana i mieszana ze znakowanym izotopowo starterem, polimerazą DNA i nukleotydami

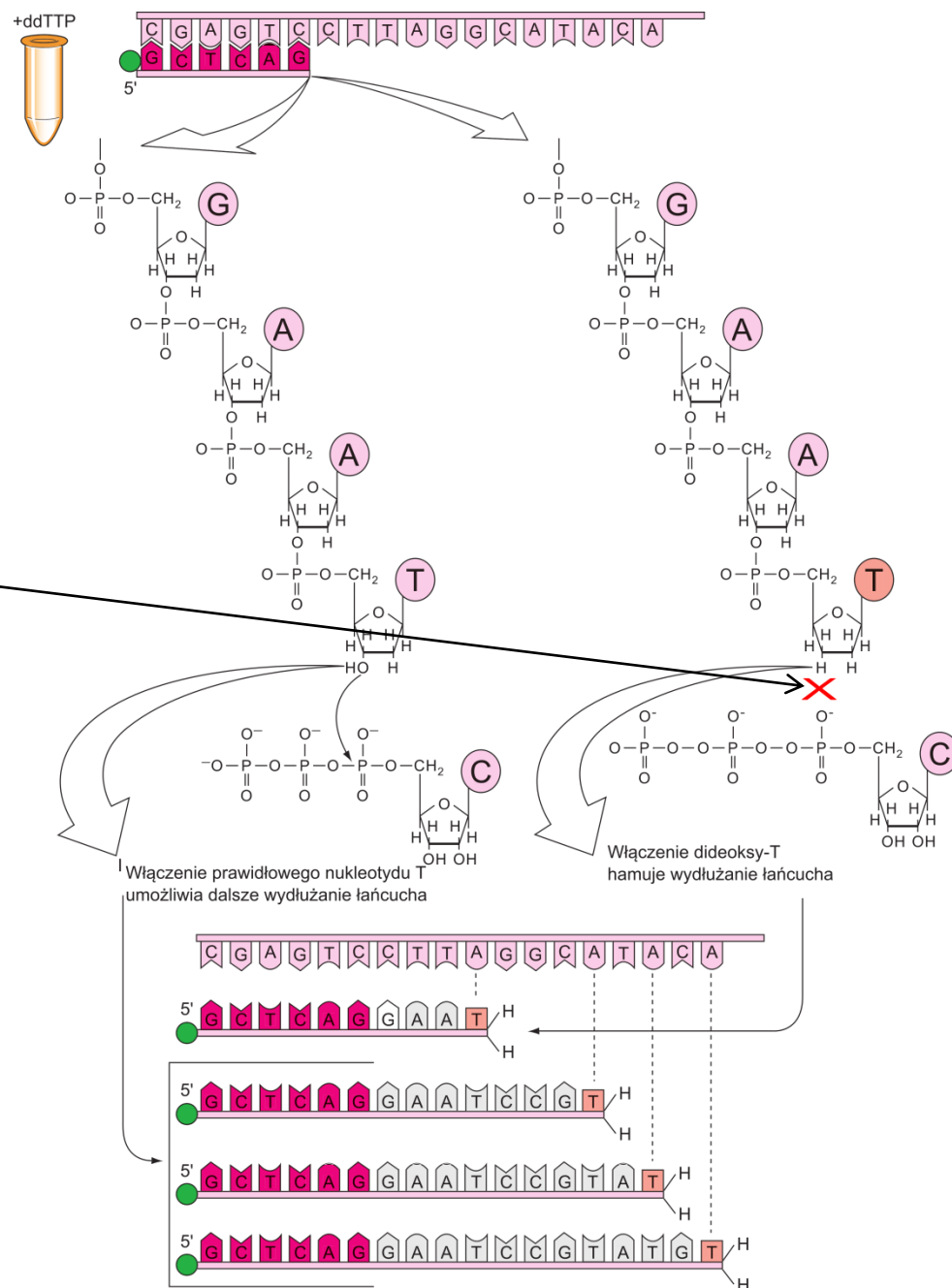


Sekwencjonowanie DNA

► Sekwencjonowanie DNA – terminacja łańcucha

► W trakcie syntezy DNA, dd-nukleotydy są włączane nowej nici tak jak d-nukleotydy, ale brak grupy 3'OH uniemożliwia dalsze wydłużanie DNA

► Każda próbka z ddT produkuje serię różnej długości fragmentów zakończonych T co odpowiada A na nici matrycowej



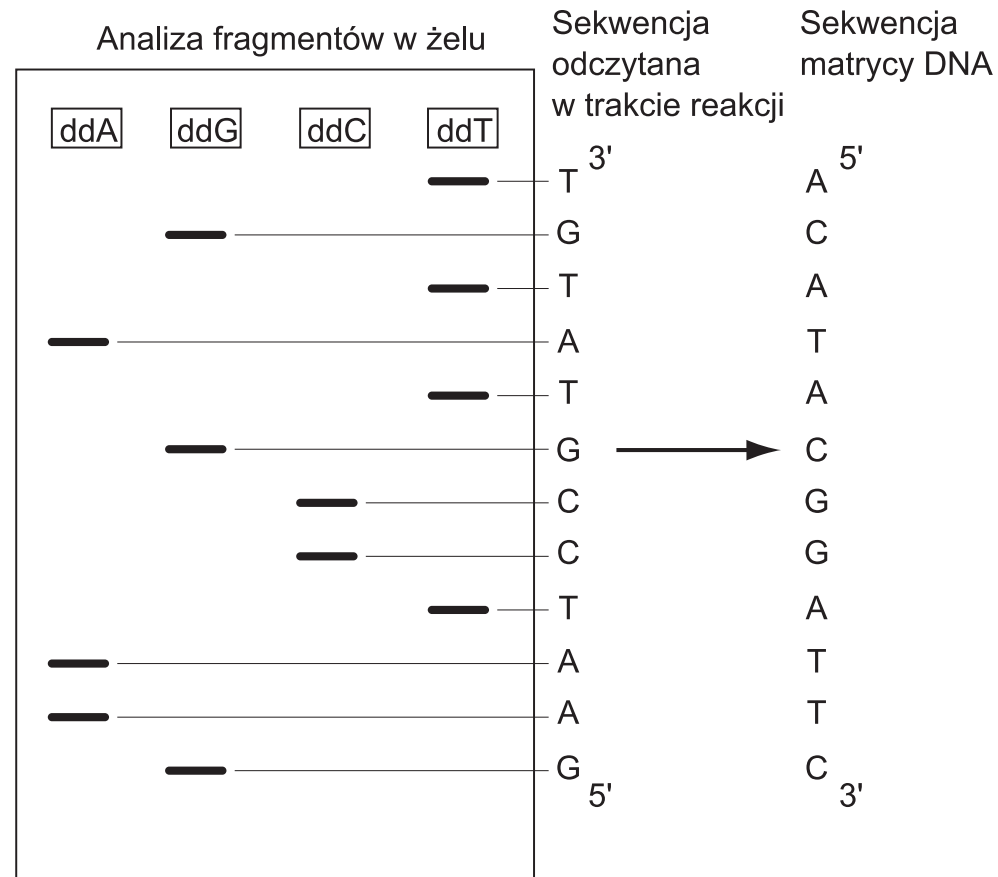
Sekwencjonowanie DNA

► Sekwencjonowanie DNA – terminacja łańcucha

► Do rozdzielenia fragmentów wygenerowanych metodą Sangera używana jest **elektroforeza w żelu poliakrylamidowym**. Metoda ta ma wystarczającą rozdzielczość, aby rozdzielić cząstki DNA różniące długością się o jeden nukleotyd

► Wizualizacja fragmentów DNA o określonej długości odpowiada specyficznym dd-nukleotydom

► Sekwencja 5'-do-3' syntetyzowanej nici jest czytana od dołu żelu



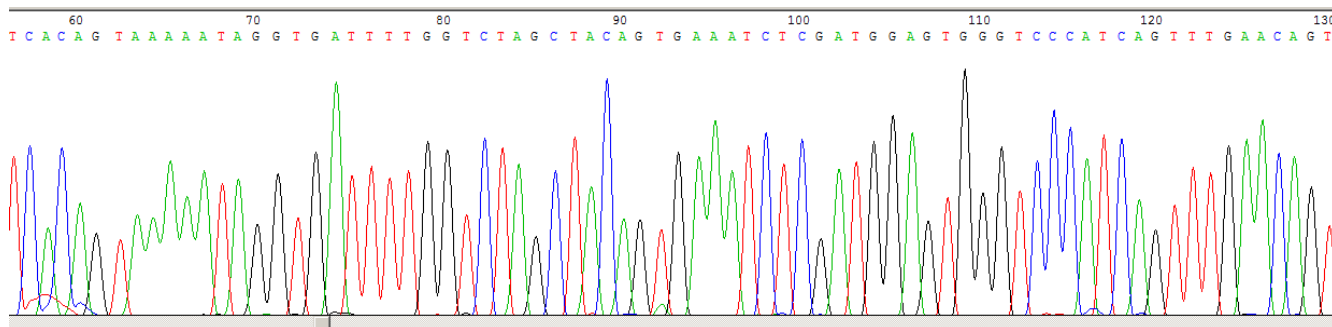
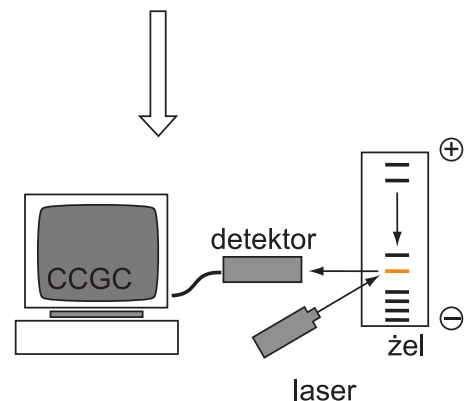
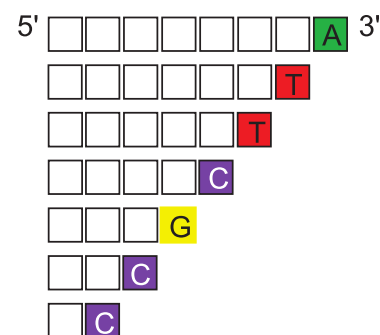
Sekwencjonowanie DNA

► Automatyczne sekwencjonowanie DNA metodą Sanger

► Każdy dd-nukleotyd jest wyznakowany różnicowo znacznikiem fluorescencyjnym i wszystkie są używane w pojedynczej reakcji

► 4 dd-nukleotydy są rozwijane w tej samej linii w żelu/kapilarze

► Sygnał jest rejestrowany jako **chromatogram** fluorescencji i zapisywany w postaci cyfrowej



Sekwencjonowanie DNA

► Automatyczne sekwencjonowanie DNA metodą Sanger

► Może dostarczyć informacji o sekwencji 500-700 pz na reakcję i ma dokładność 99.9%

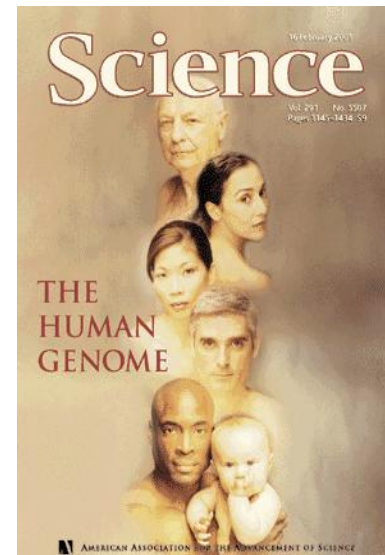
► metoda Sanger na dwie dekady zdominowała sekwencjonowanie dzięki automatyzacji – użyta do wygenerowania sekwencji genomu ludzkiego

► Niska przepustowość i wysokie koszty dużych projektów tj. badanie genomów



2001: *Human Genome Project*

2,7 Mld \$, 11 lat

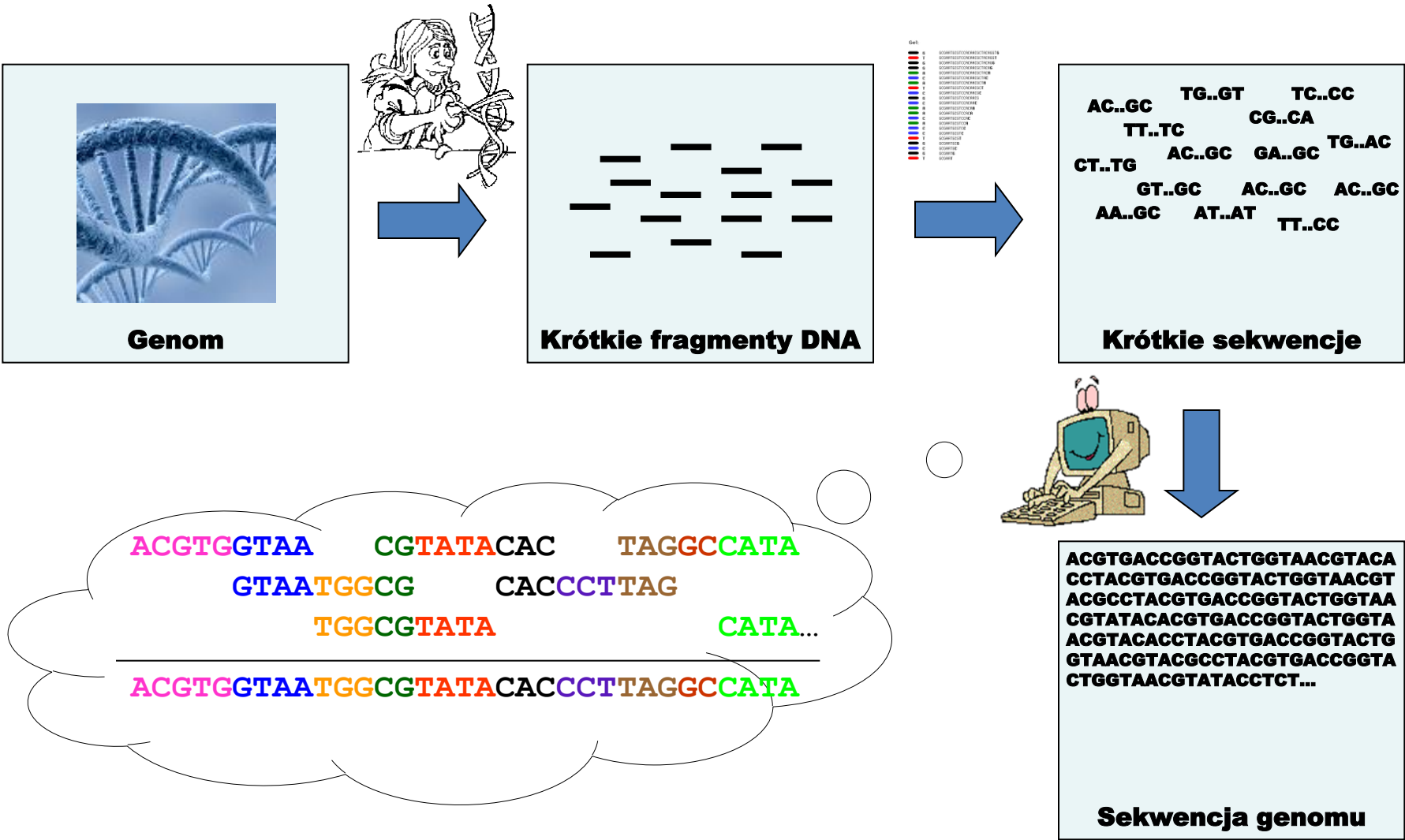


2001: *Celera*

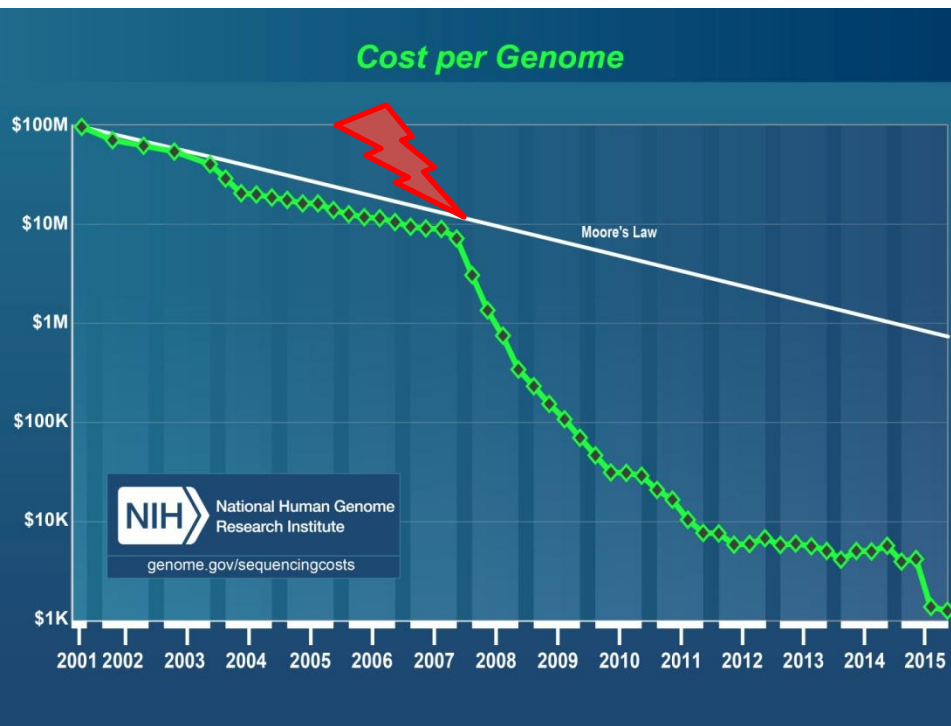
100Mln \$, 3 lata

Sekwencjonowanie DNA

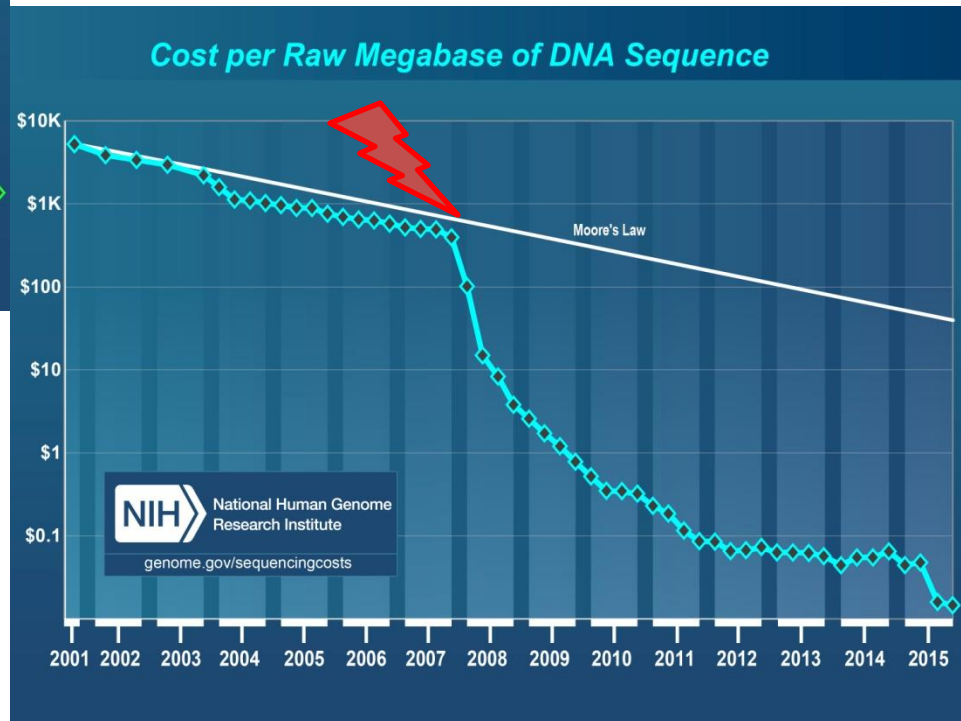
► Sekwencjonowanie genomu typu shotgun – ogólna koncepcja



Sekwencjonowanie DNA

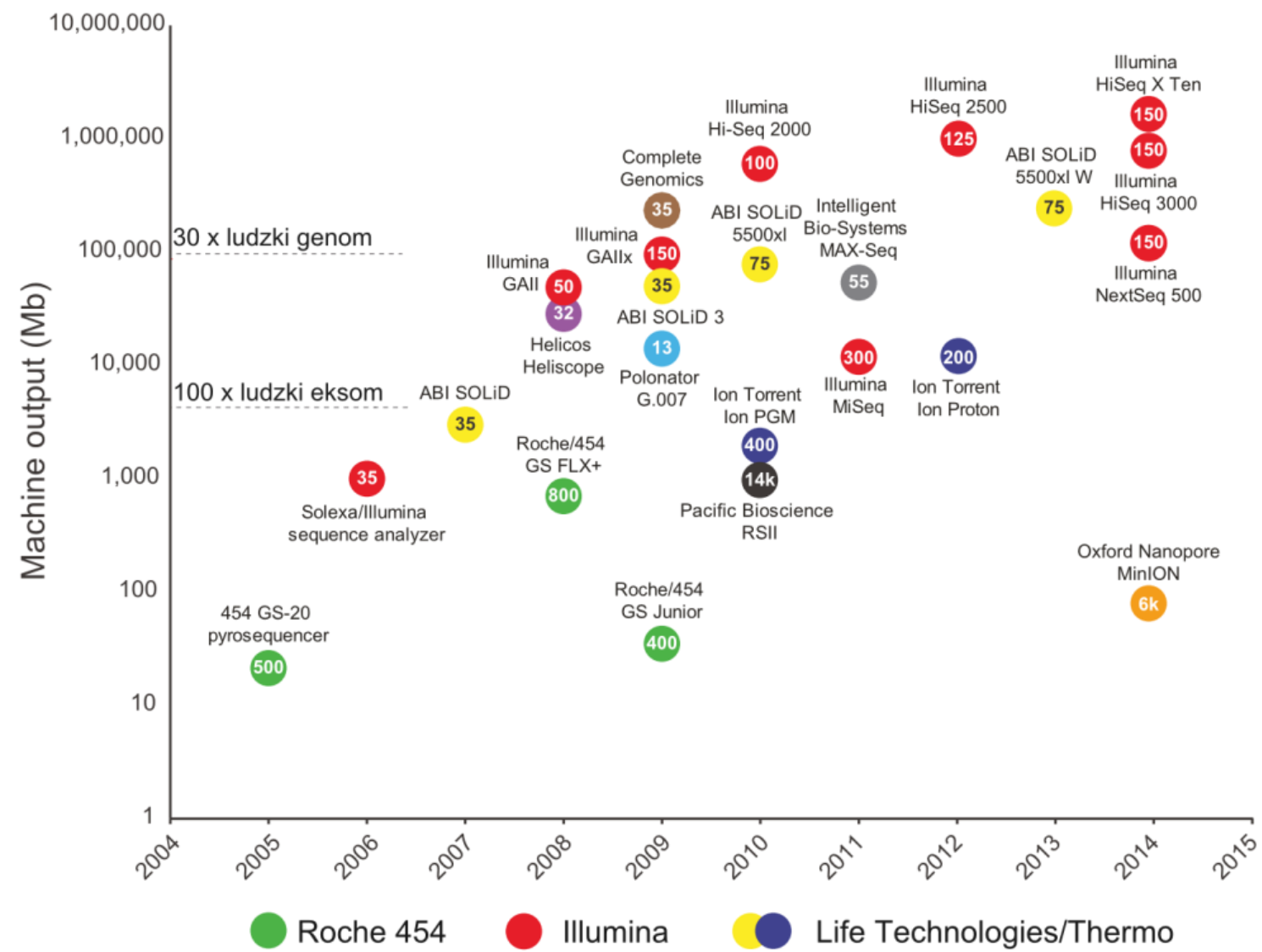


~1000\$ za ludzki genom



0.014\$ za Mb

Sekwencjonowanie DNA

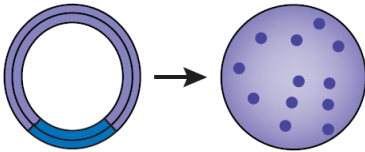


Sekwencjonowanie DNA

► Sekwencjonowanie genomu typu shotgun – masywne, równoległe sekwencjonowanie przez syntezę DNA (sekwencjonowanie nowej generacji)

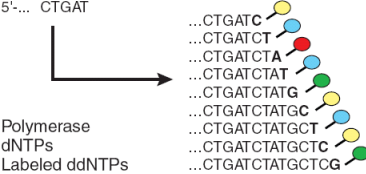
Sanger

In vivo cloning and amplification

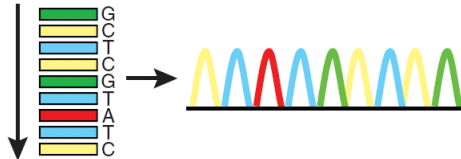


Cycle sequencing

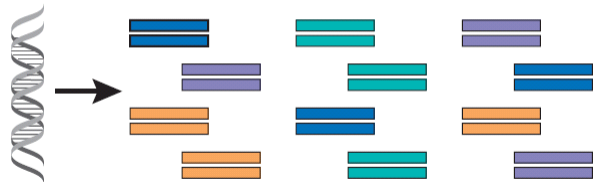
(template) 3'-... GACTAGATACGAGCGTGA...-5'
(primer) 5'-... CTGAT



Electrophoresis (1 read/capillary)

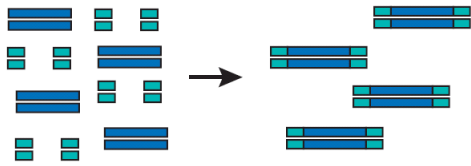


DNA fragmentation

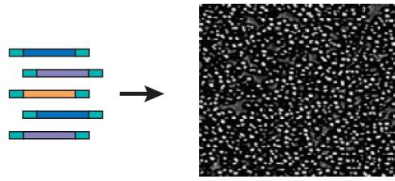


Polony

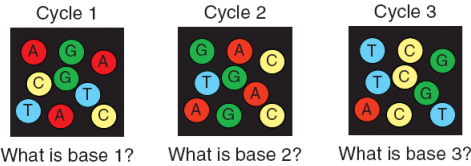
In vitro adaptor ligation



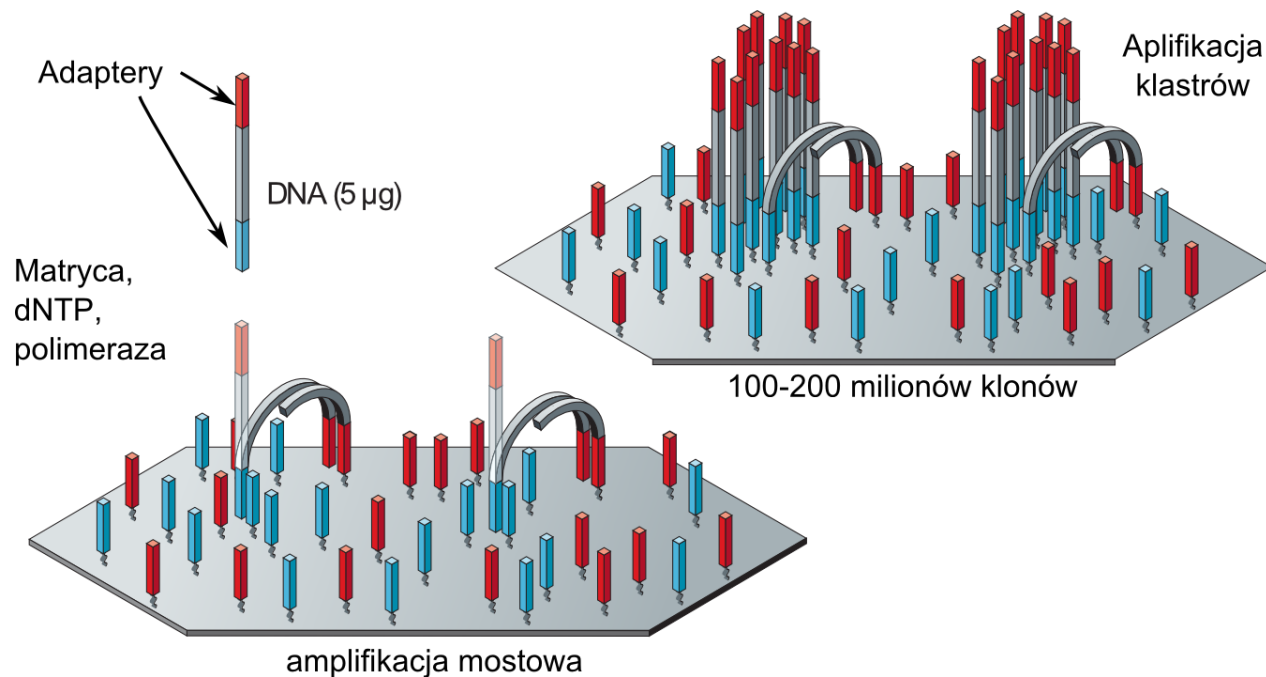
Generation of polony array



Cyclic array sequencing (>10⁶ reads/array)



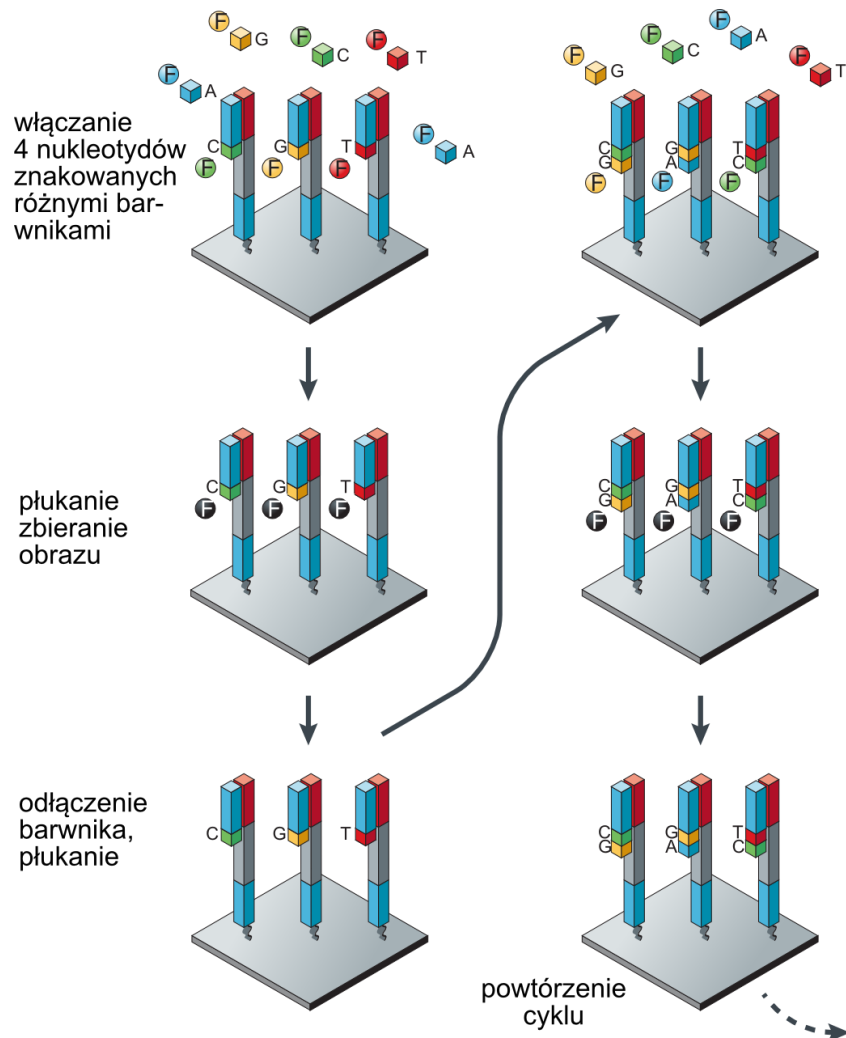
Klonalna amplifikacja fragmentów DNA z użyciem mostowego PCR (platforma Illumina)



- Biblioteka shotgun DNA (z adapterami) wiązana „mostowo” do powierzchni płytki
- Każdy klonalny klaster zawiera ~1000 kopii zamplifikowanego fragmentu biblioteki

Sekwencjonowanie DNA

Sekwencjonowanie przez inkorporację znakowanych fluorescencyjnie nukleotydów - Illumina



Kamera CCD zbiera obraz i archiwizuje w postaci pliku TIFF

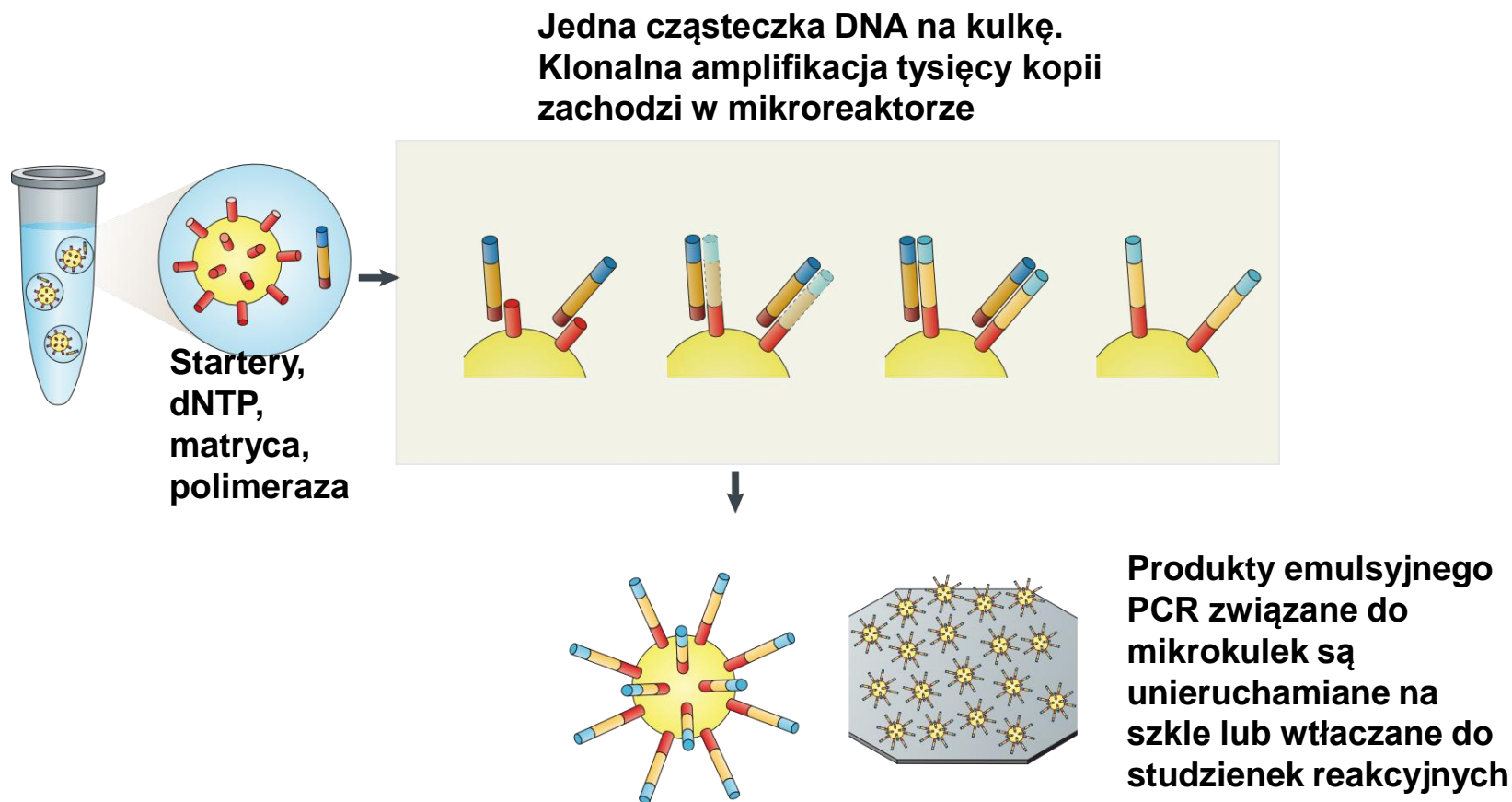


Oprogramowanie "tłumaczy" obraz na sekwencję nukleotydową



sekwencja górna: CATCGT
sekwencja dolna: CCCCCC

Klonalna amplifikacja fragmentów DNA z użyciem emulsyjnego PCR (platformy 454, SOLiD, Ion Torrent)



Sekwencjonowanie DNA

Sekwencjonowanie bez układu optycznego na czipach półprzewodnikowych – PGM Ion Torrent, IonProton (Life Technologies)



PGM - Trzy rodzaje czipów:

314 – 20Mb (1,2M)

316 - 200Mb (6,1M)

318 – 1Gb (11M)

Długość odczytu do 400 pz

Ion proton

Ion Proton Chip I – 10Gb (165M)

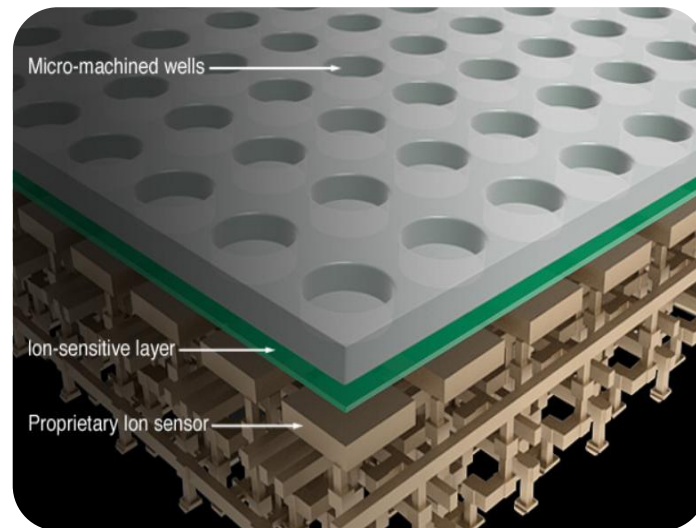
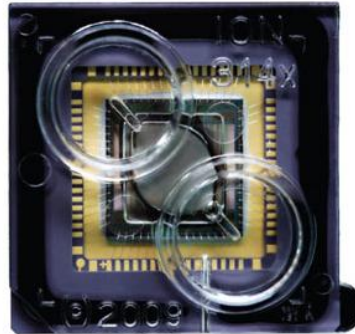
Ion Proton Chip II – 30Gb (660M)

Pojemność ludzkiego genomu za cenę
< 1000\$

Ion Proton Chip III – 200Gb (1200M)

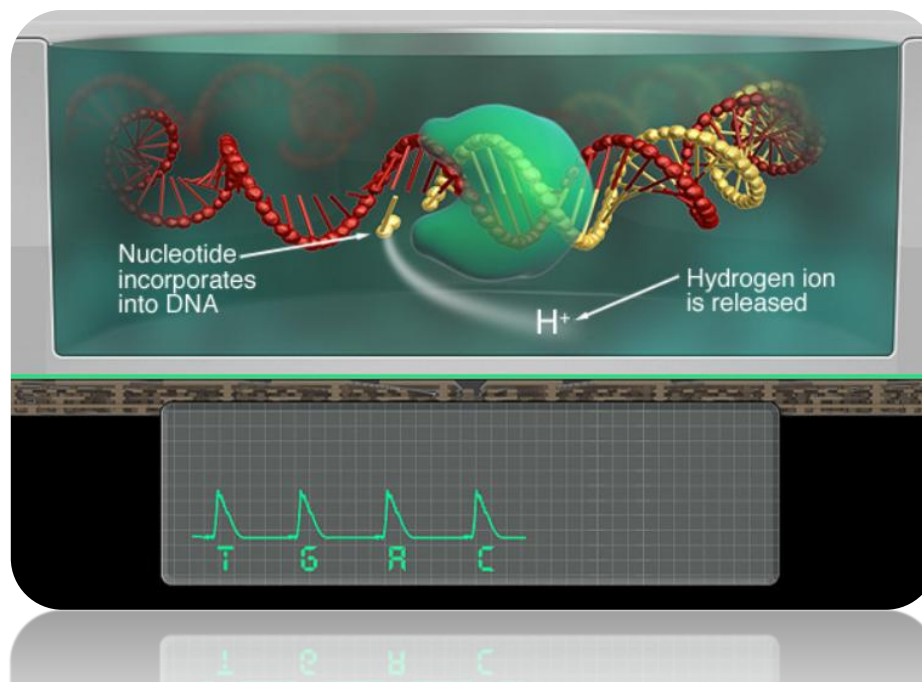
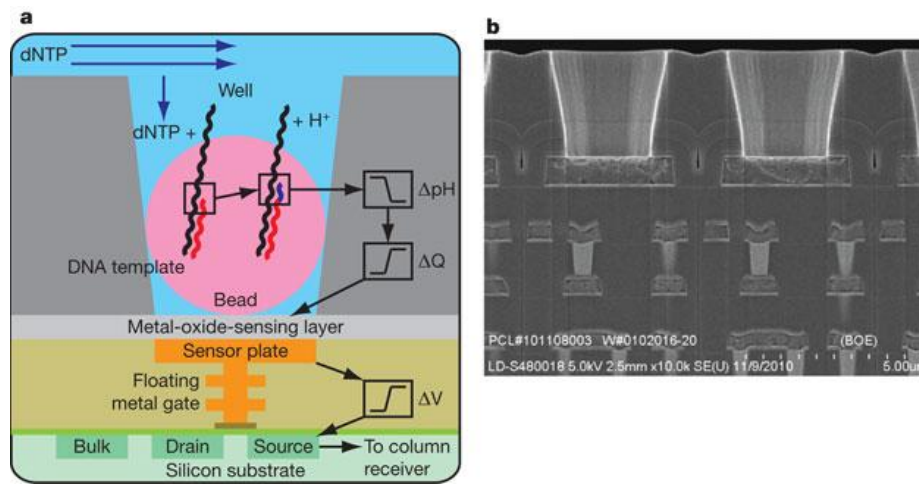


Sekwencjonowanie bez układu optycznego na czipach półprzewodnikowych – Ion Torrent, Proton



Sekwencjonowanie DNA

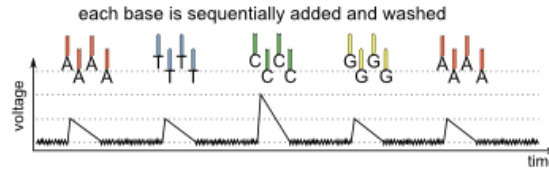
Odczyt wbudowanego nukleotydu przez pomiar zmiany pH



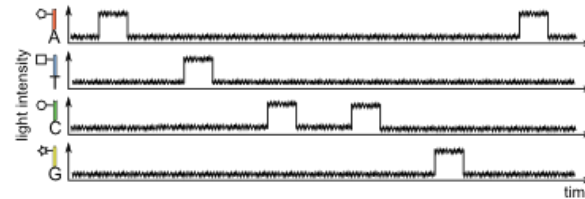
Sekwencjonowanie DNA



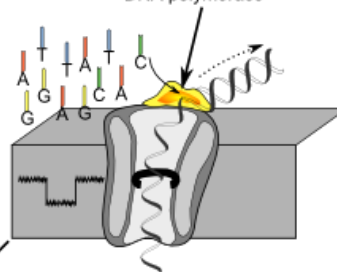
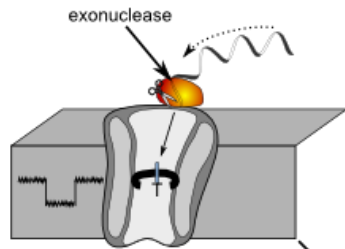
matryca DNA: TAGGCT



<http://www.kurzweilai.net/sequencing-a-human-genome-in-one-day-for-1000>



(D) GridION - sekwencjonowanie przez syntezę nici homologicznej



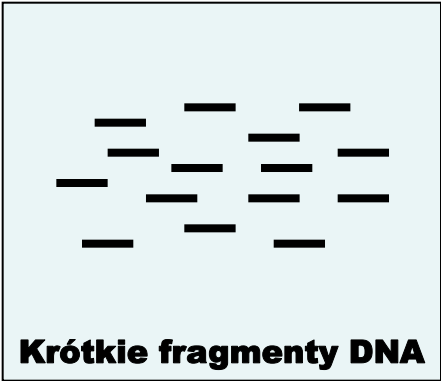
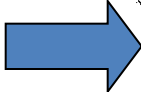
<http://www.nanoporetech.com>

Sekwencjonowanie DNA

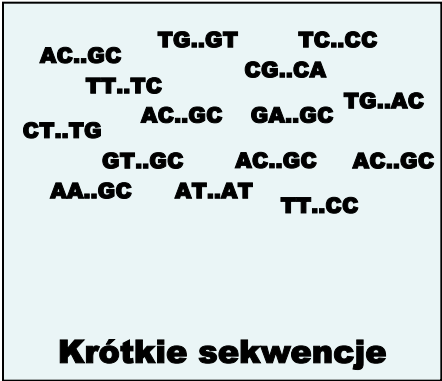
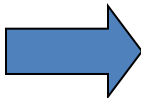
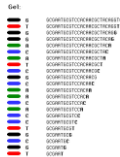
► Sekwencjonowanie nowej generacji



Genom, eksomy,
RNA, amplikony itd.



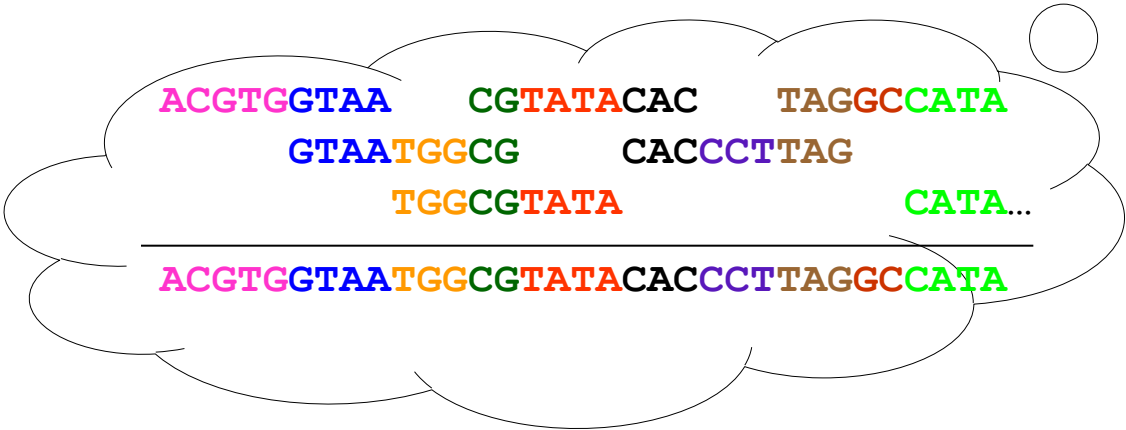
Krótkie fragmenty DNA



Krótkie sekwencje



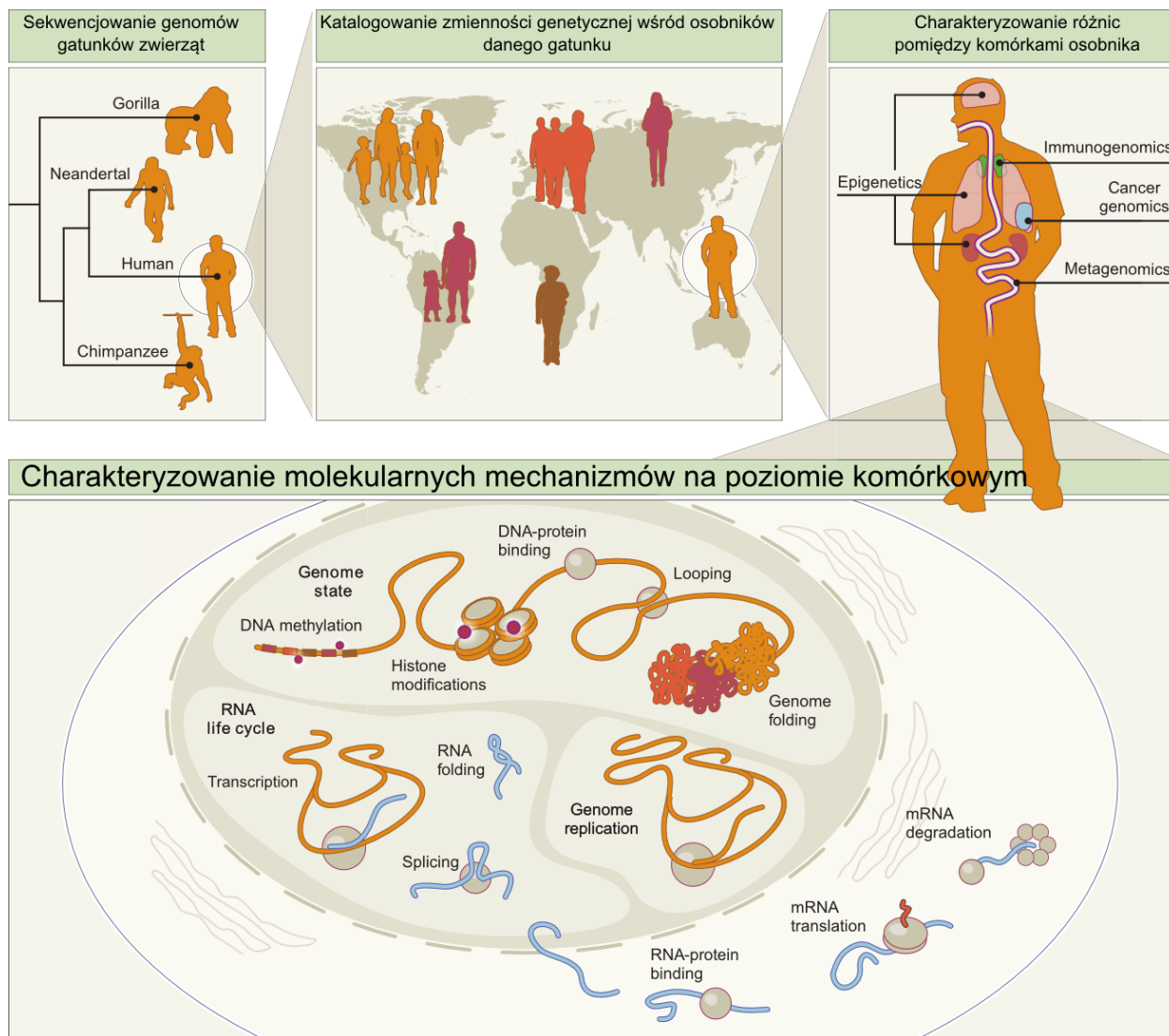
Składanie
sekwencji

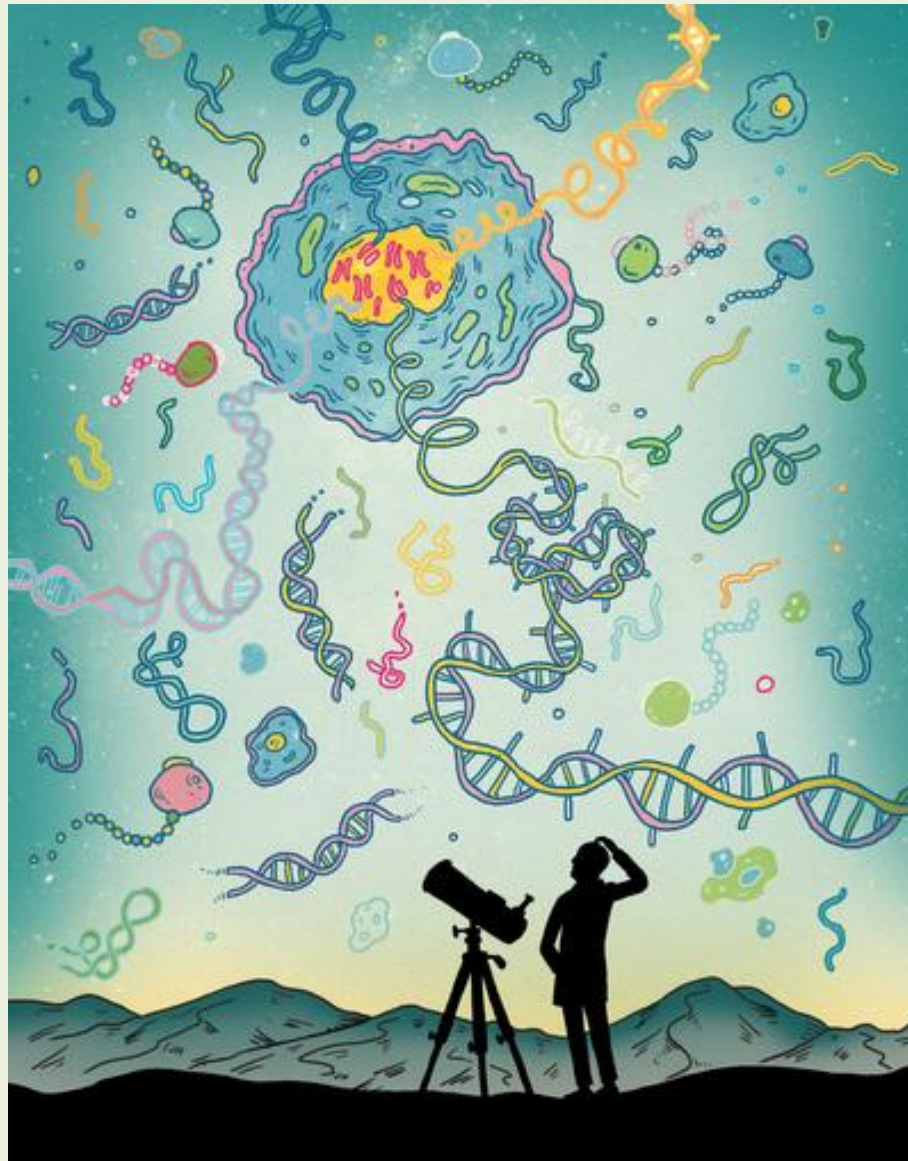


Sekwencja/
Informacja ilościowa

Sekwencjonowanie DNA

► Sekwencjonowanie nowej generacji - zastosowanie





Nature 496, 419–420 (25 April 2013) Autor: ANDREW RAE