
Gerações de Sequenciamento

— SCC02713 - Introdução à Bioinformática —

Fontes:

<https://www.youtube.com/watch?v=XPzMRyqEMkA>

<https://www.youtube.com/watch?v=kzmMurV0umw>

Evolução das Técnicas de Sequenciamento

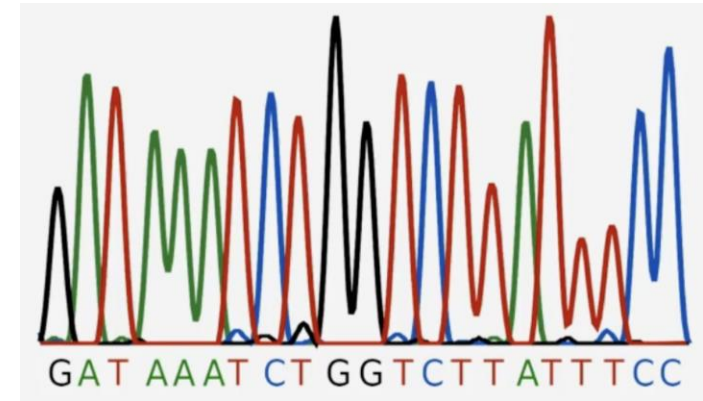
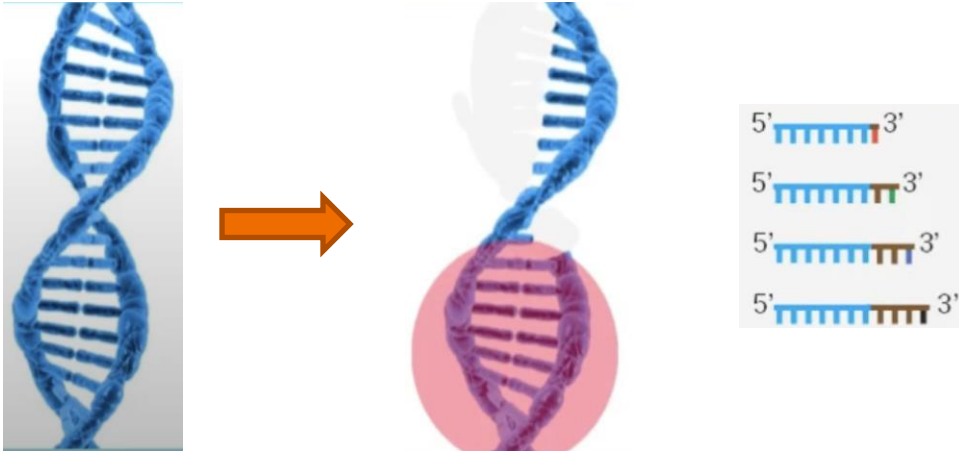
- Histórico



Sequenciamento Sanger

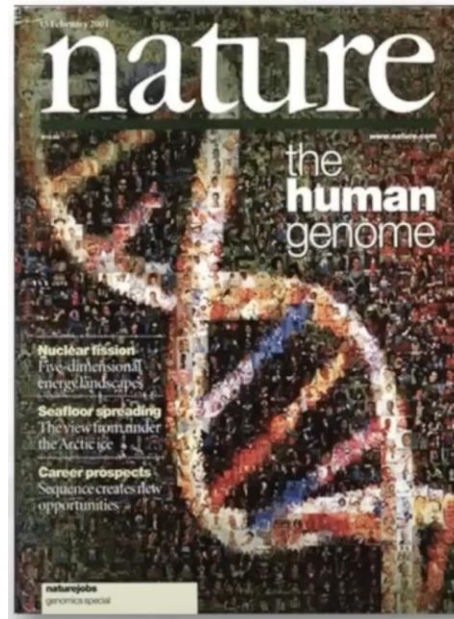


- Método mais utilizado por várias décadas:
 - Baseado na incorporação seletiva de dideoxynucleotídeos que terminam a extensão da molécula durante o processo



Sequenciamento Sanger

- Projeto Genoma Humano



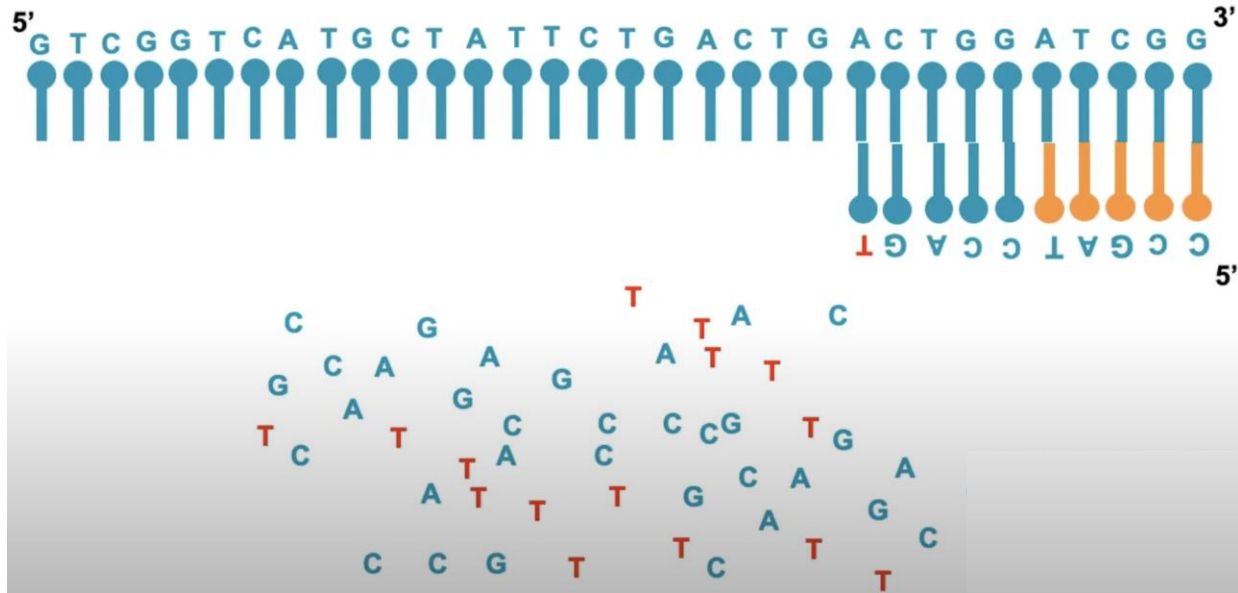
Sequenciamento Sanger

- Síntese de DNA por uma polimerase
 - Utiliza nucleotídeo “defeituoso”



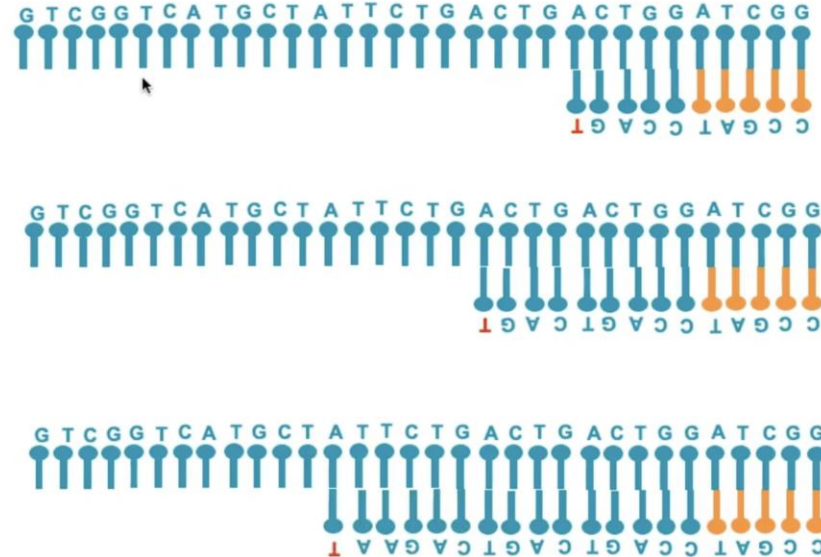
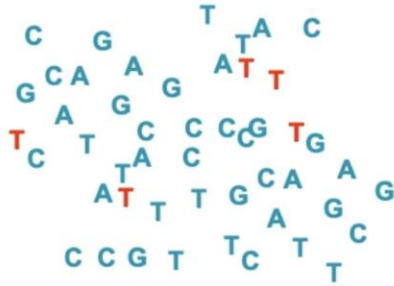
Sequenciamento Sanger

- Síntese de DNA – ddNTP
 - Utiliza nucleotídeo “defeituoso”



Sequenciamento Sanger

- Síntese de DNA – dNTP e ddNTP



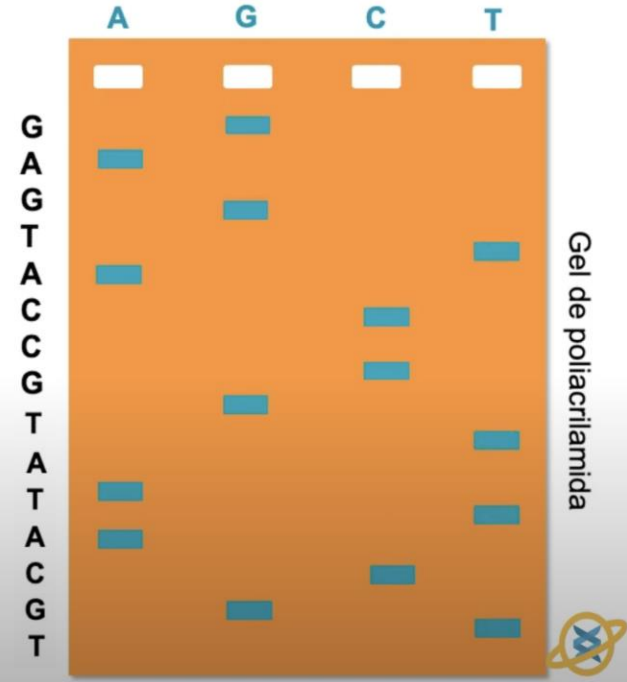
Sequenciamento Sanger

- Geração de fragmentos de todos os tamanhos. Em cada tubo:
 - DNA alvo, que queremos sequenciar
 - DNA polimerase: replicação
 - Primer: inicia a síntese
 - dNTP
 - Um tipo de ddNTP



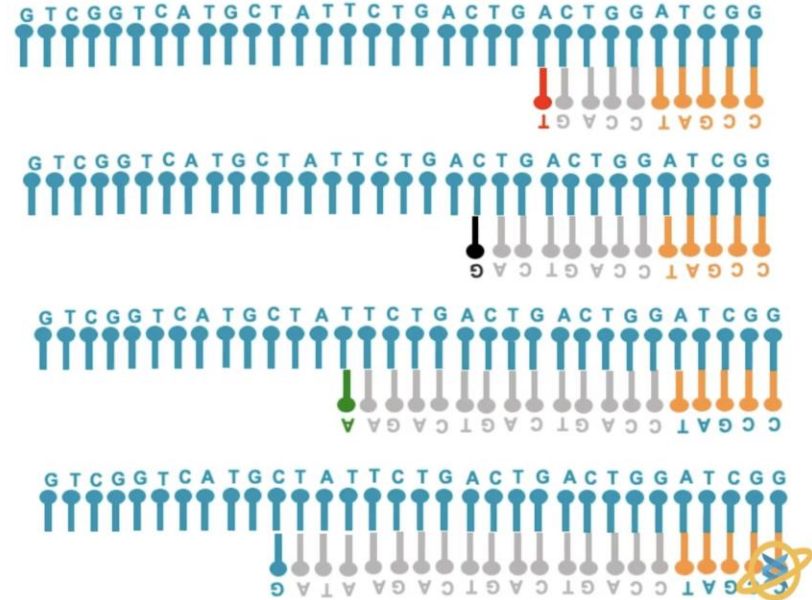
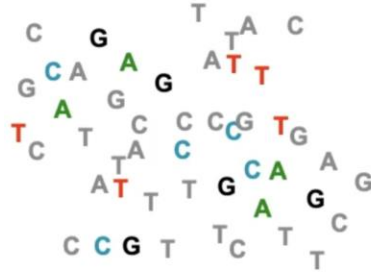
Sequenciamento Sanger

Muito custoso!
Isso era feito antigamente!



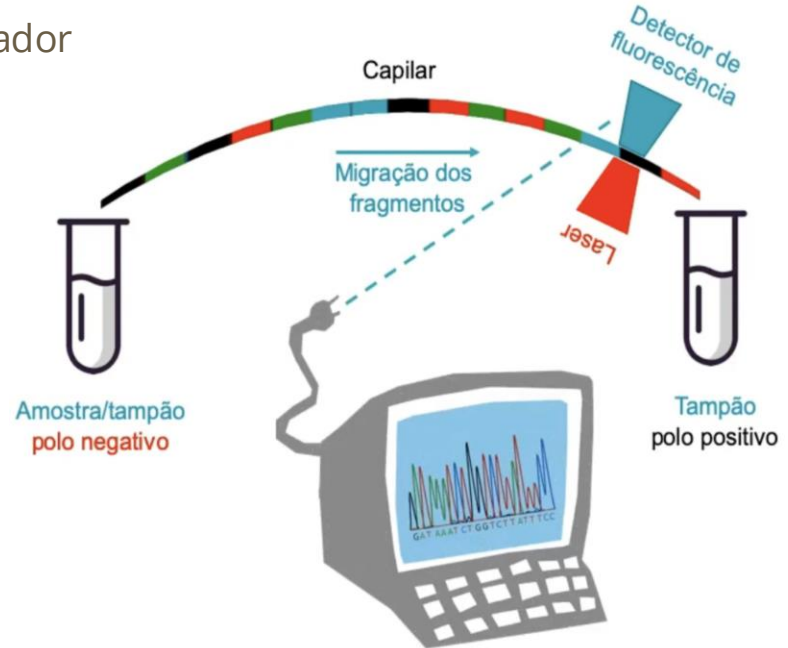
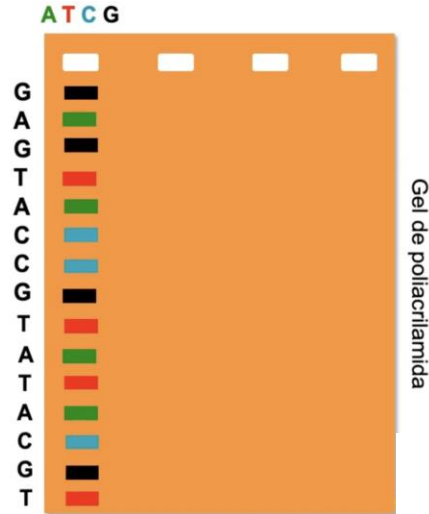
Sequenciamento Sanger

- Marcação dos ddNTPs com fluoróforos
 - Usa apenas um tubo



Sequenciamento Sanger

- Geração de fragmentos de todos os tamanhos.
 - Usa-se um capilar ao invés de gel e um computador

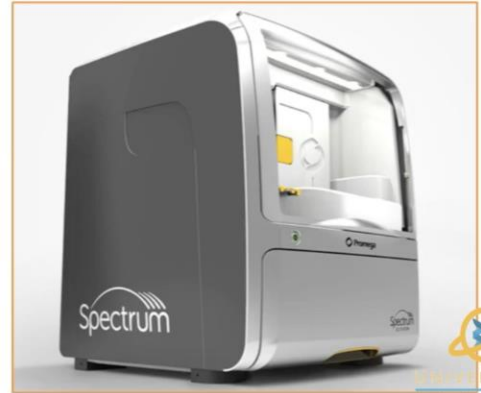


Sequenciamento Sanger



SeqStudio
Thermo Fisher

Spectrum
Promega



Sequenciamento Sanger



Evolução das Técnicas de Sequenciamento

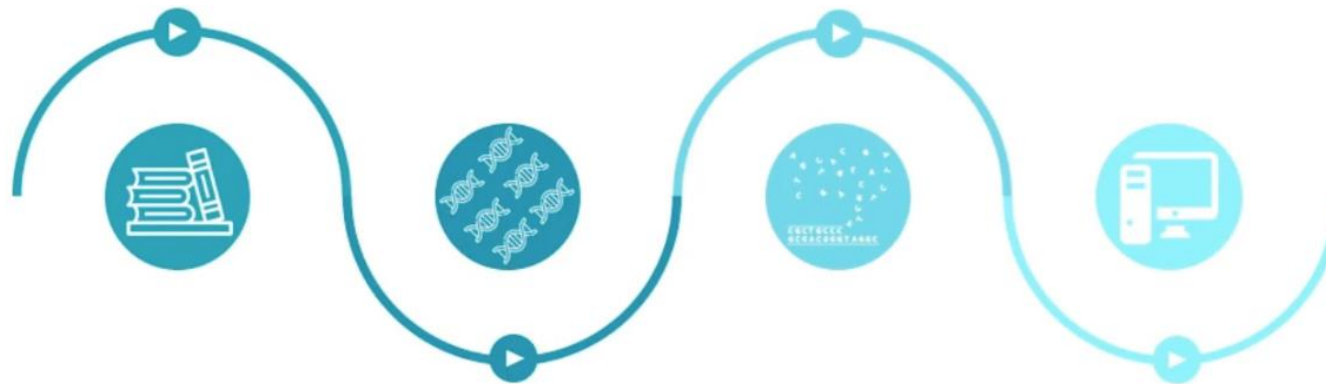
- Histórico



Sequenciamento de Segunda Geração

- Sequenciamento Sanger
 - Alta precisão e acurácia, porém baixa capacidade de produção e alto custo
- Sequenciamento de Nova Geração (NGS)
 - Produção em larga escala e diminuição de custo
 - Amplificação em massa de fragmentos de DNA e sequenciamento em paralelo
- Possível sequenciar genomas inteiros em questão de dias
 - Custo muito menor
 - Identificação de variantes genéticas
 - Identificação de mutações
 - ...

Sequenciamento de Segunda Geração



Biblioteca

Geração de fragmentos de tamanhos compatíveis com a tecnologia. Adição de adaptadores e marcadores.

Amplificação

Geração de cópias de cada fragmento a ser sequenciado.

Sequenciamento

Processo de leitura da sequência

Análise dos dados

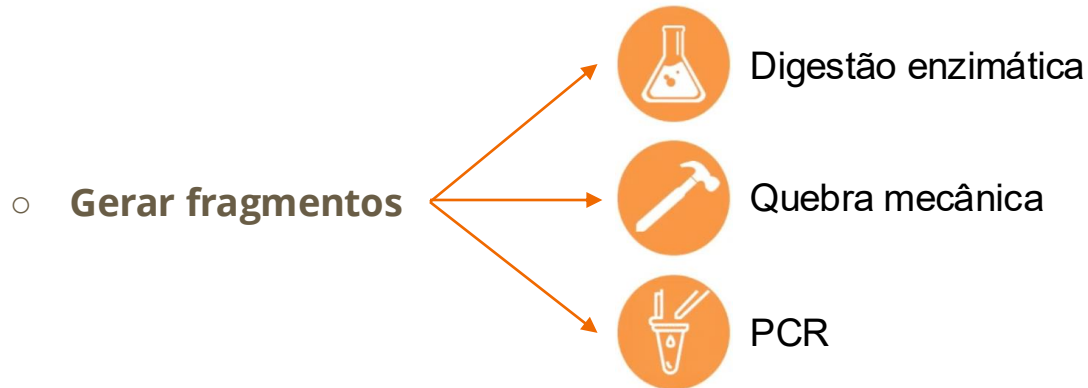
Alinhamento, montagem, quantificação, chamada de bases, chamada de variantes.



Sequenciamento de Segunda Geração

- Construção da biblioteca

- Gerar fragmentos
- Adicionar adaptadores às extremidades dos fragmentos
- Adicionar marcadores de amostra



Sequenciamento de Segunda Geração

- Construção da biblioteca
 - Gerar fragmentos
 - Adicionar adaptadores às extremidades dos fragmentos
 - Adicionar marcadores de amostra
- **Adicionar adaptadores às extremidades dos fragmentos**
 - DNA conhecido



Sequenciamento de Segunda Geração

- Construção da biblioteca
 - Gerar fragmentos
 - Adicionar adaptadores às extremidades dos fragmentos
 - Adicionar marcadores de amostra
- **Adicionar marcadores de amostra**

Fragmentos da amostra A

A horizontal bar representing a DNA fragment. It is divided into four segments: a red segment on the left, a small black segment, a long blue segment, and a green segment on the right.

Fragmentos da amostra B

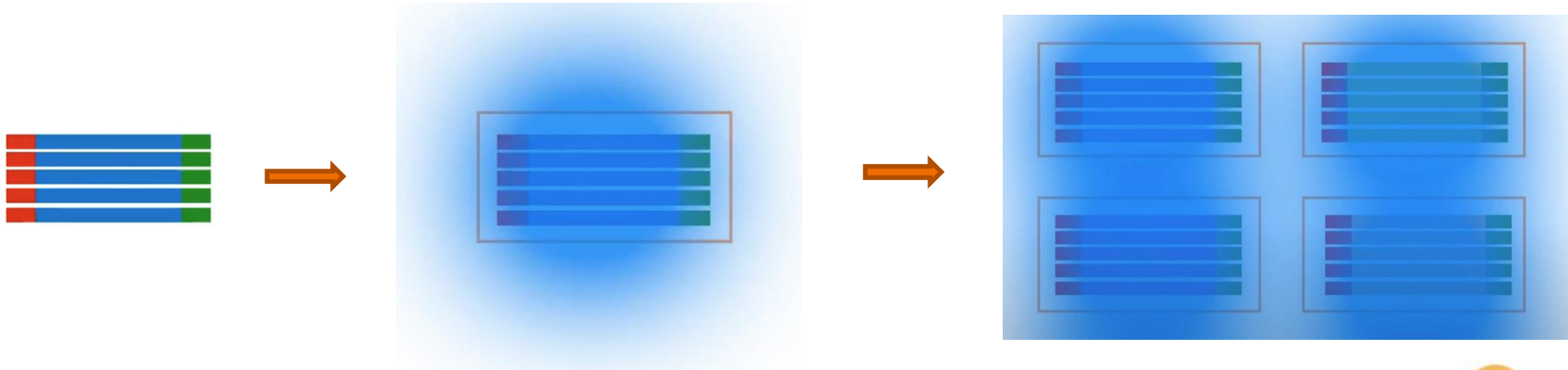
A horizontal bar representing a DNA fragment. It is divided into four segments: a red segment on the left, a small purple segment, a long blue segment, and a green segment on the right.

Fragmentos da amostra C

A horizontal bar representing a DNA fragment. It is divided into four segments: a red segment on the left, a small yellow segment, a long blue segment, and a green segment on the right.

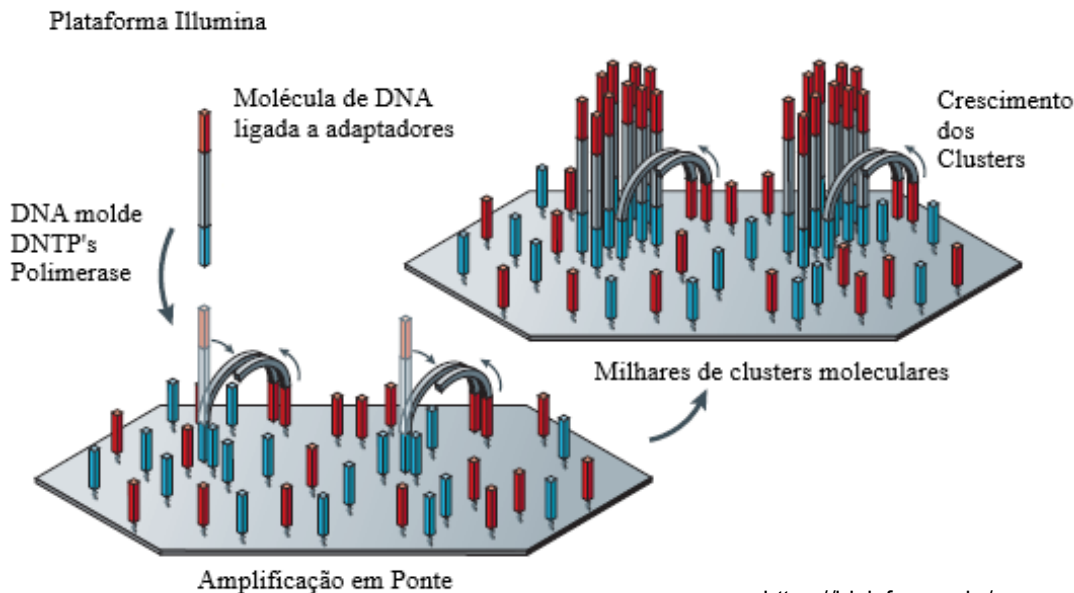
Sequenciamento de Segunda Geração

- Amplificação
 - PCR para geração de fluorescência



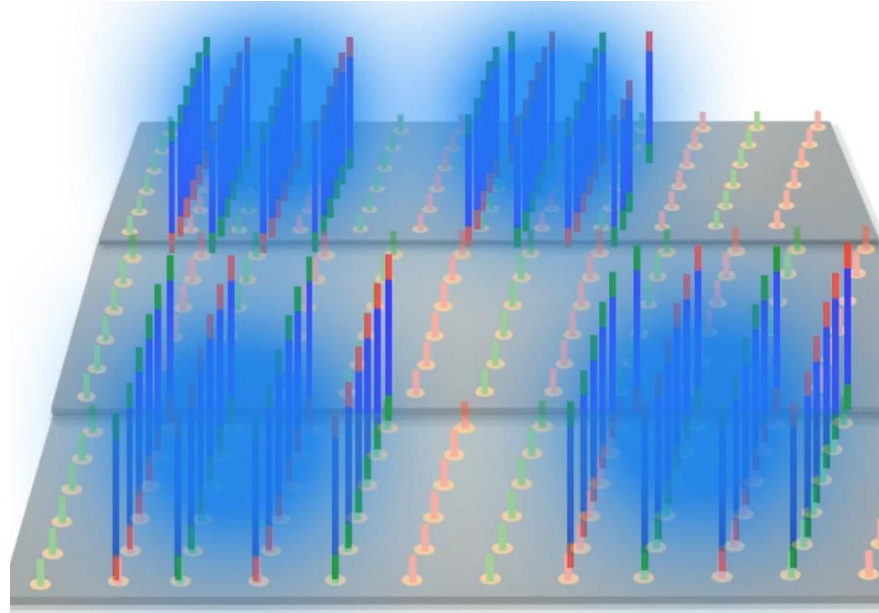
Sequenciamento de Segunda Geração

- Amplificação - Illumina
 - Primers complementares aos adaptadores



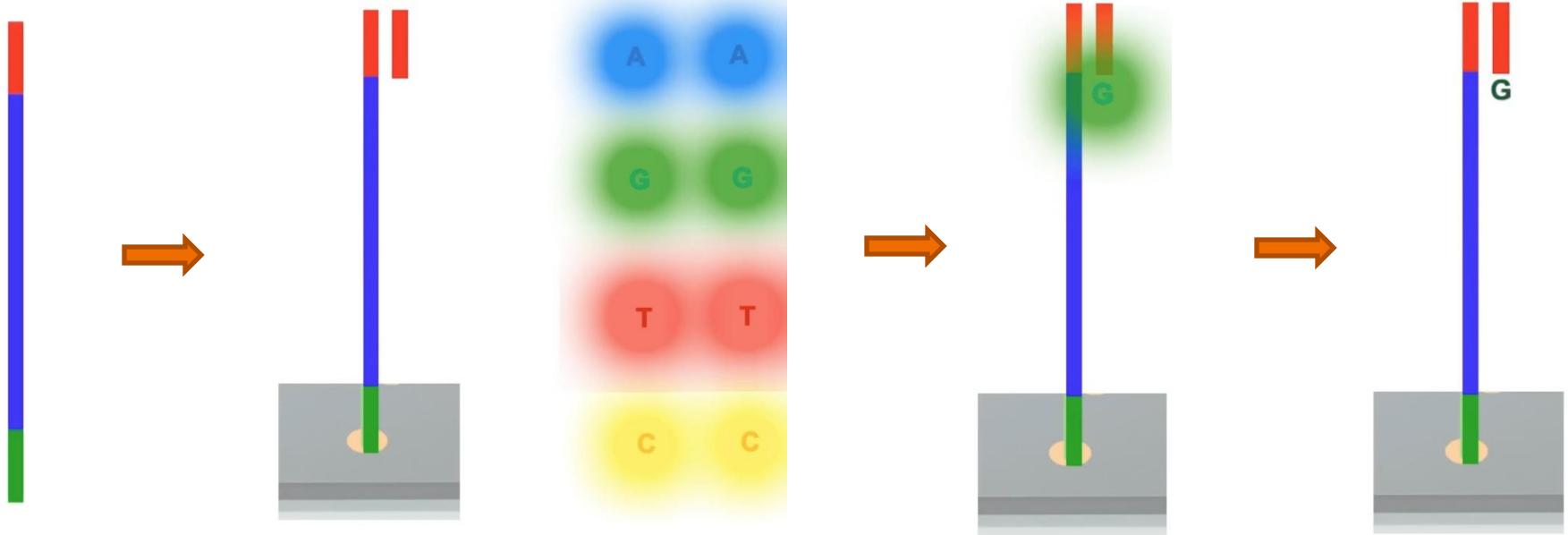
Sequenciamento de Segunda Geração

- Amplificação - Illumina
 - Primers complementares aos adaptadores
 - Fluorescência



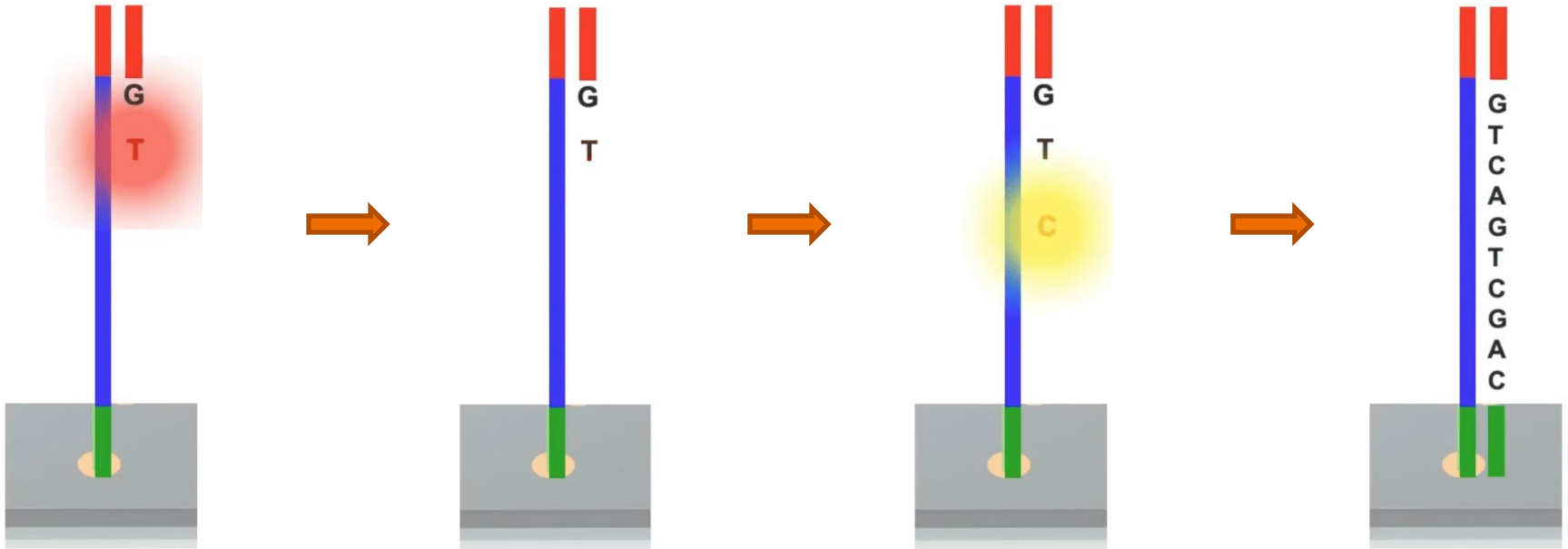
Sequenciamento de Segunda Geração

- Sequenciamento - Illumina



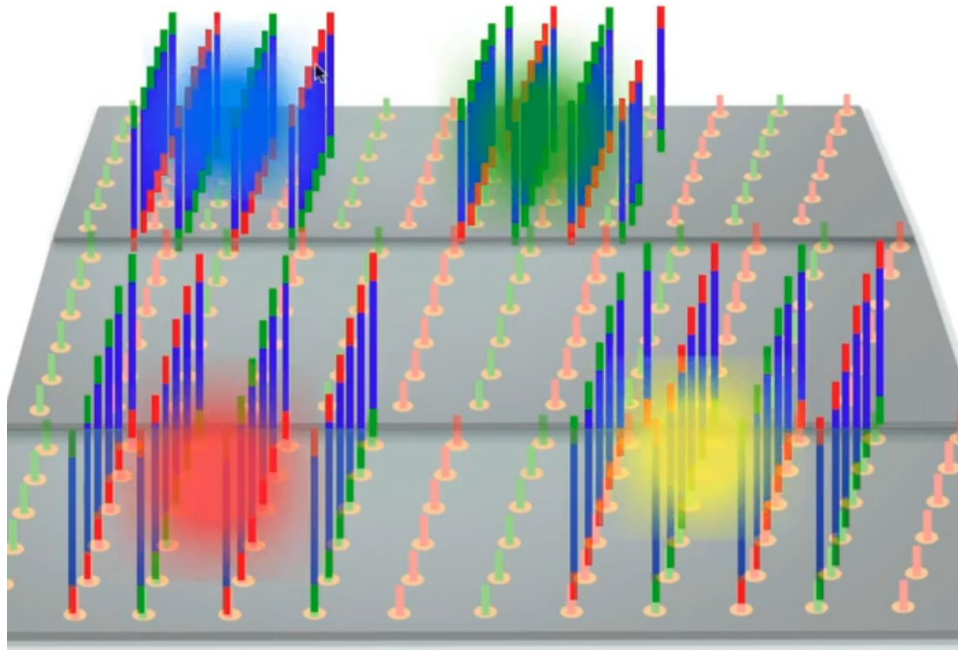
Sequenciamento de Segunda Geração

- Sequenciamento - Illumina



Sequenciamento de Segunda Geração

- Sequenciamento - Illumina



Sequenciamento de Segunda Geração

- Plataforma Illumina



NovaSeq 6000



MiSeq

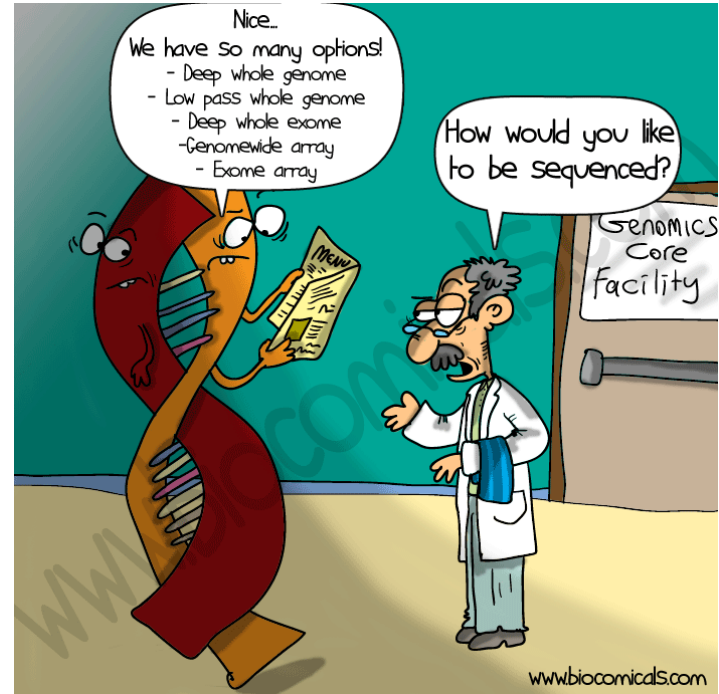
Sequenciamento de Segunda Geração



Sequenciamento de Segunda Geração

- Várias aplicações

- Genotipagem
- Identificação humana
- Metagenoma
- Detecção de mutação
- Análise de expressão gênica
- Detecção de aneuploidias
- Sequenciamento *de novo*
- Sequenciamento de exoma



Evolução das Técnicas de Sequenciamento

- Histórico



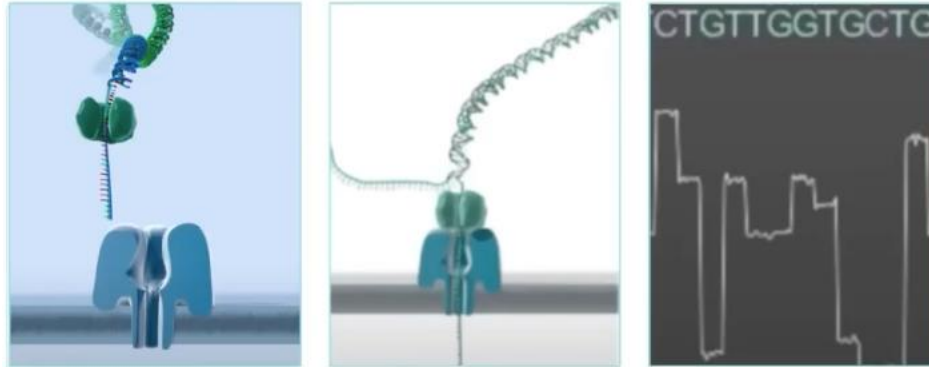
Sequenciamento de Terceira Geração

- Sequenciamento em tempo real
 - Leitura direta da sequência de nucleotídeos do DNA
 - Não há necessidade de amplificar sequências e sintetizar cópias
- Diferentes abordagens
 - Detecção de mudanças na condutividade elétrica
 - Detecção de incorporação de nucleotídeos fluorescentes durante a síntese de DNA
- Leitura de sequências muito mais longas
 - Útil para montagem de genomas complexos
 - Identificação de variantes genéticas em regiões de difícil sequenciamento



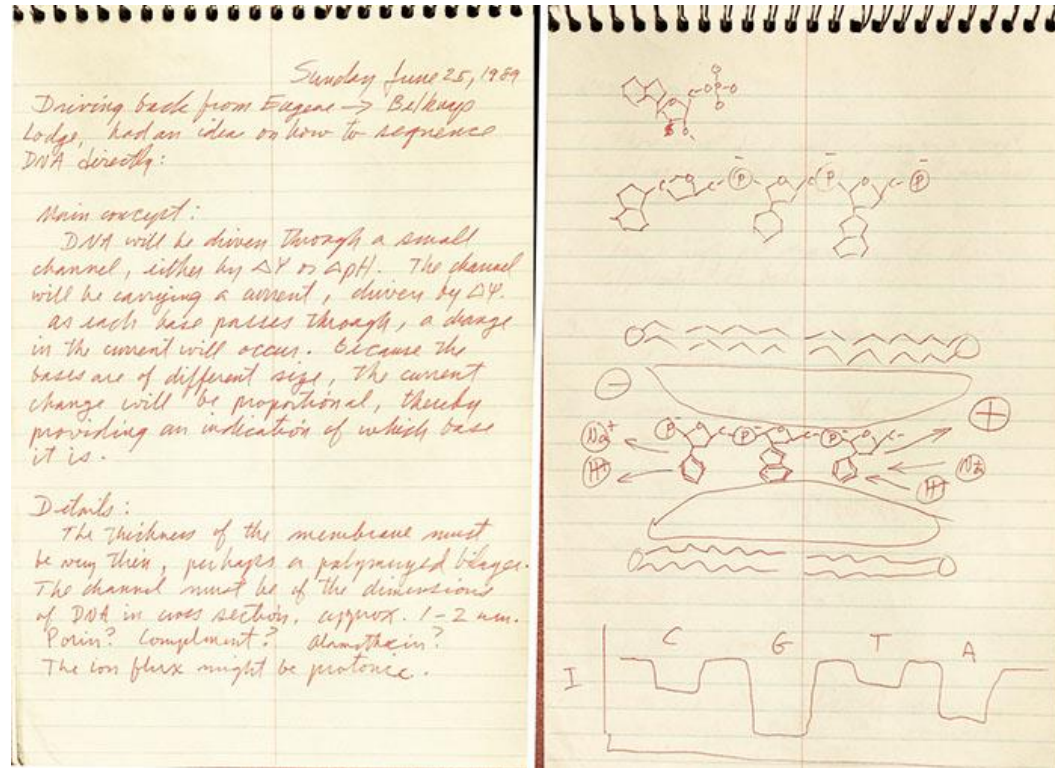
Sequenciamento de Terceira Geração

- Sequenciamento por nanoporos
 - Não há necessidade de grandes sequenciadores
 - Capacidade de sequenciar fragmentos de milhões de pares de bases
 - Sem amplificação prévia
 - Processo de geração de dados diferente. Não é síntese.



Sequenciamento de Terceira Geração

- O esboço inicial do professor David Deamer para sequenciar o DNA usando um nanoporo



Sequenciamento de Terceira Geração

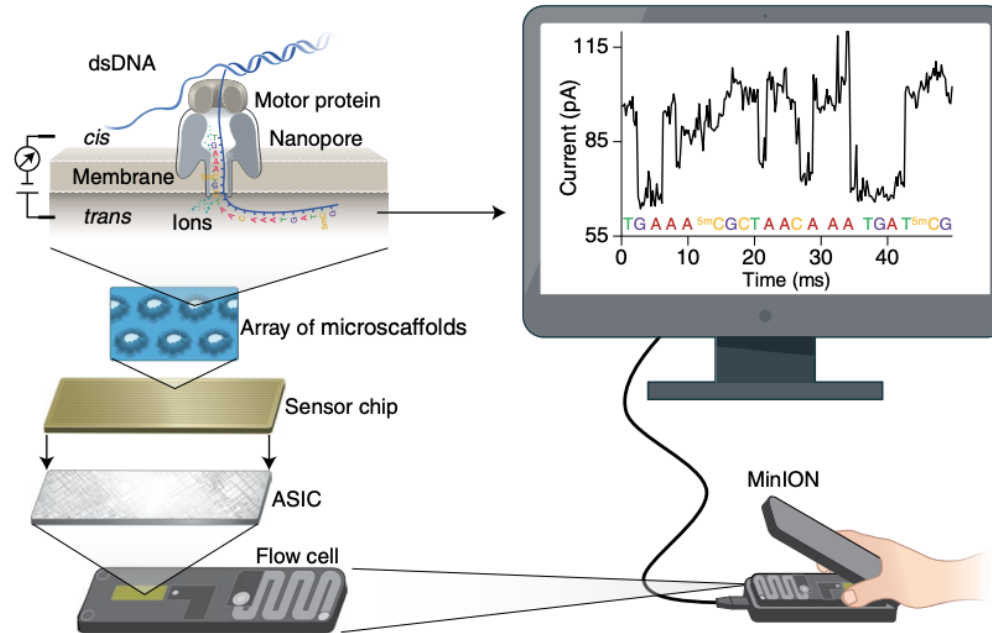


- Sequenciamento por nanoporos - MinION



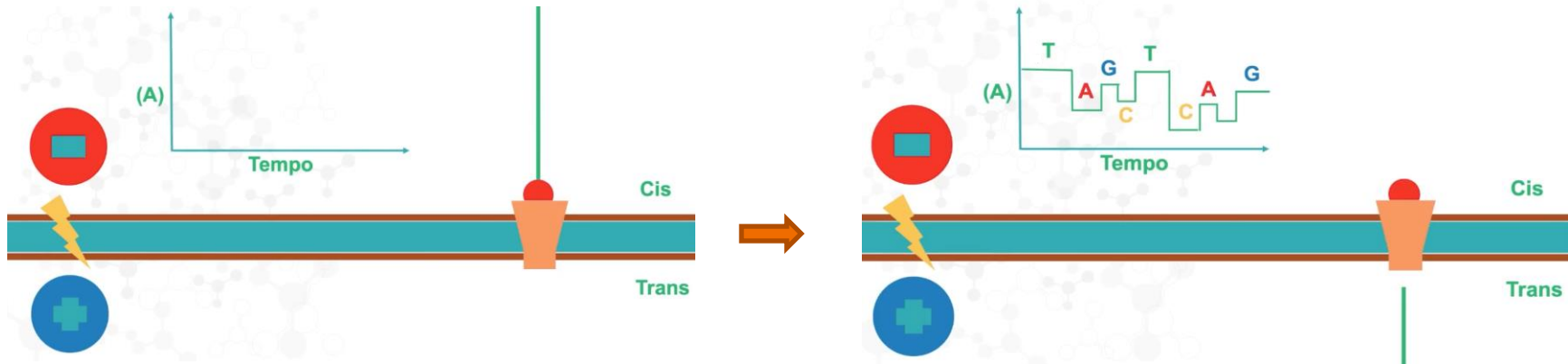
Sequenciamento de Terceira Geração

- Sequenciamento por nanoporos - MinION



Sequenciamento de Terceira Geração

- Sequenciamento por nanoporos - MinION



Sequenciamento de Terceira Geração

- Sequenciamento por nanoporos - MinION

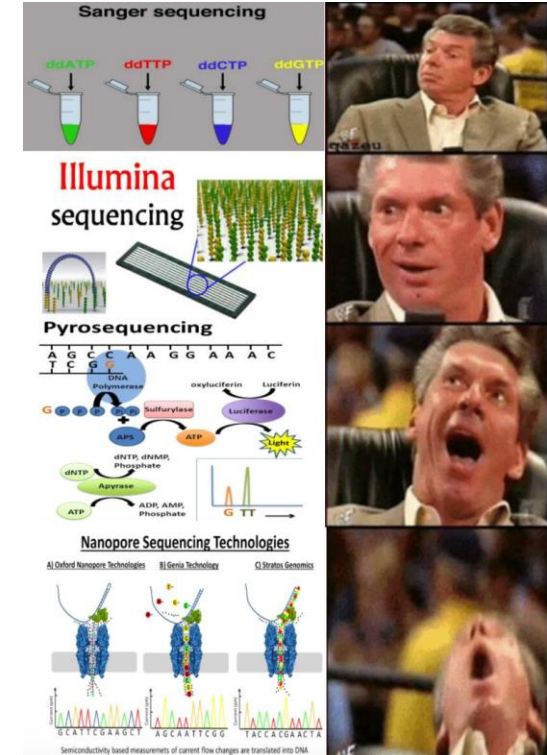
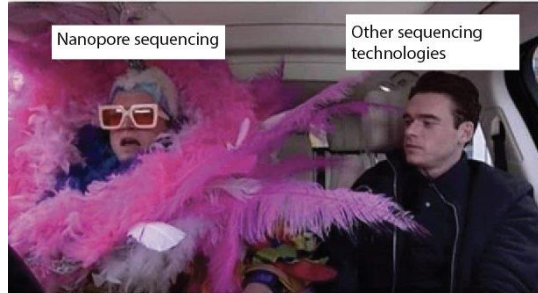


<https://www.cshl.edu/genome-sequencing-goes-mobile-at-dnalc/>

<https://directorsblog.nih.gov/2018/02/06/sequencing-human-genome-with-pocket-sized-nanopore-device/>

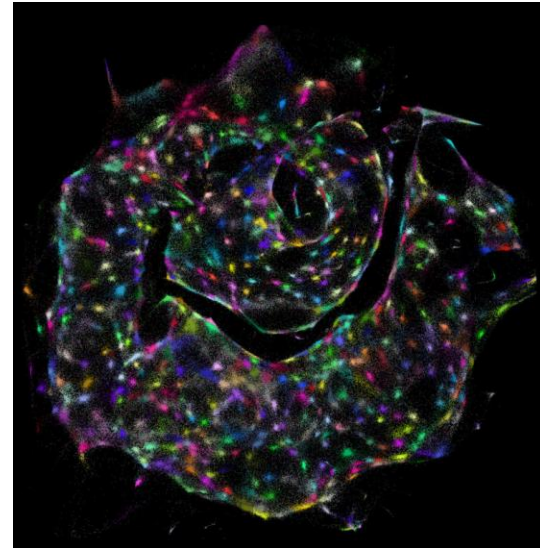
Sequenciamento de Terceira Geração

- Várias aplicações
 - Montagem de genomas de qualidade superior
 - Identificação de modificações epigenéticas em larga escala
 - Sequenciamento de regiões altamente repetitivas no genoma



Sequenciamento de Quarta Geração

- Ainda em desenvolvimento
 - Nada disponível comercialmente
 - Novas gerações de tecnologias por nanoporos
 - Técnicas baseadas em microscopia





<https://www.bbc.com/future/article/20230210-the-man-whose-genome-you-can-read-end-to-end>