

Fundamentos do NGS

2024-06-03

texto baseado neste video do eduardo castan

introdução ao NGS / sequenciamento de Segunda geração

O NGS são algumas técnicas de sequenciamento desenvolvidas e englobadas por duas principais empresas, **thermo-fisher** e **illumina**. Apesar de se divergerem na tecnologia e patentes, ambas as tecnologias possuem o mesmo fluxo de trabalho/princípio de funcionamento.

Fluxo de trabalho de NGS

'''' Preparo de biblioteca -> Amplificação -> Sequenciamento -> Análise ''''

Geração de biblioteca

Essa é uma etapa comum aos sequenciamentos de ácidos nucleicos, etapa a qual é responsável por preparar a amostra para que ela seja compatível a tecnologia.

Amplificação

As tecnologias necessitam amplificar os fragmentos de DNA para que o equipamento possa alcançar a sensibilidade necessária para a o sequenciamento

Sequenciamento

Está é a etapa a qual o equipamento consegue ler / distinguir as bases em sequência correta que estão no genoma

Analise

Está é a etapa de análise dos dados gerados pelo sequenciamento

preparo de biblioteca

Gerar fragmentos

Existem uma limitação na tecnica, ela não consegue sequenciar fragmetos muito grandes > 600pb. Apenas de 200-250pb. Por isso é necessário fragmentar esse genôme, com enzimas, sonicação ou pcr. Está pcr é uma super multiplex, que consegue pegar todos o genes

Adicionar adaptadores nas extremidades dos fragmentos

é adicionado um dna dupla fita nas extremidades dos fragmentos, e são ligados por DNA-liage

Adicionar marcadore de amostra

- thermofish = barcode
- ilumina = index

vem nos adaptadores, e são sequencias específicas que serve para separar as amostras mesmo fazendo uma reação em um tubo so.

Amplificação

Apartir desse momento as tecnologias de diferen em relação a amplificação da amostra