Fundamentos do NGS

2024-06-03

[texto baseado neste video do eduardo castan](https://www.youtube.com/watch?v=uKCCIAhLFrU)

# introdução ao NGS / sequênciamento de Segunda geração

O NGS são algumas tecnicas de sequênciamento desenvolvidas e englobadas por duas pricipais empresas, thermo-ficher e ilumina. Apesar de se divergerem na tecnologia e patêntes, ambas as tecnologias possuem o mesmo fluxo de trabalho/princípio de funcionamento.

## Fluxo de trabalho de NGS

´´´´ Preparo de biblioteca -> Amplificação -> Sequênciamento -> Análise ´´´´

# Geração de biblioteca

Essa é uma etapa comum aos sequênciamentos de ácidos núcleicos, etapa a qual é responsavel 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 sequênciamento

# Sequênciamento

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

# Analise

Está é a etapa de análise dos dados gerados pelo sequênciamento

# 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 DNAliagese

### Adicionar marcadore de amostra

* thermofish = barcode
* ilumina = index

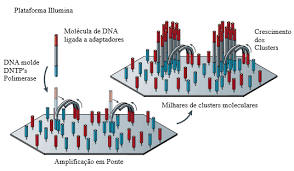
vem nos adaptadores, e são sequencias expecíficas que serve para separar as amostras mesmo fazendo uma reação em um tubo so.

# Amplificação

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

## Ilumina

A tecnica de amplificação da ilumina é baseada em uma pcr em ponte uma forma de pcr a qual em um chip com uma região complementar aos adaptadores presentes no fragmento, assim fixando verticalmente o fragmento ao chip. Neste local é realizado a amplificação do alvo com a pcr e como há diversas dessas regiões complemntares espalhadas ao longo do chip, é criado uma ponte durante a amplificação, tornando possível a detecção de florecencia de nucleotídeos adaptados para emitir uma florecencia expecífica ao passo que a pcr avança, permitindo assim ao sequênciamento pois a tecnologia da ilumina se baseaia na emissão de um sinal de florecência. com este método é possivel gerar um sinal forte o suficiente para ser detectável

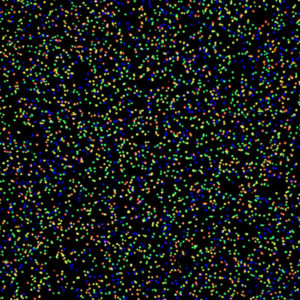


PCR em ponte

O fragmento de dna fica com o formato de ponte pois na superfície há primeres complementares ás sequências dos adaptadores, adicionados na parte de construção de bibliotecas com o primer ligado ao fragmento, durante os ciculos de pcrs, serão gerados novos fragmentos presos por pontes, as quais serão quebradas as ligações entre os primeres para ser aplificadas novamente, aumentando a superfície de florecência gerando assim clusteres de fragmentos.

## Sequênciamento

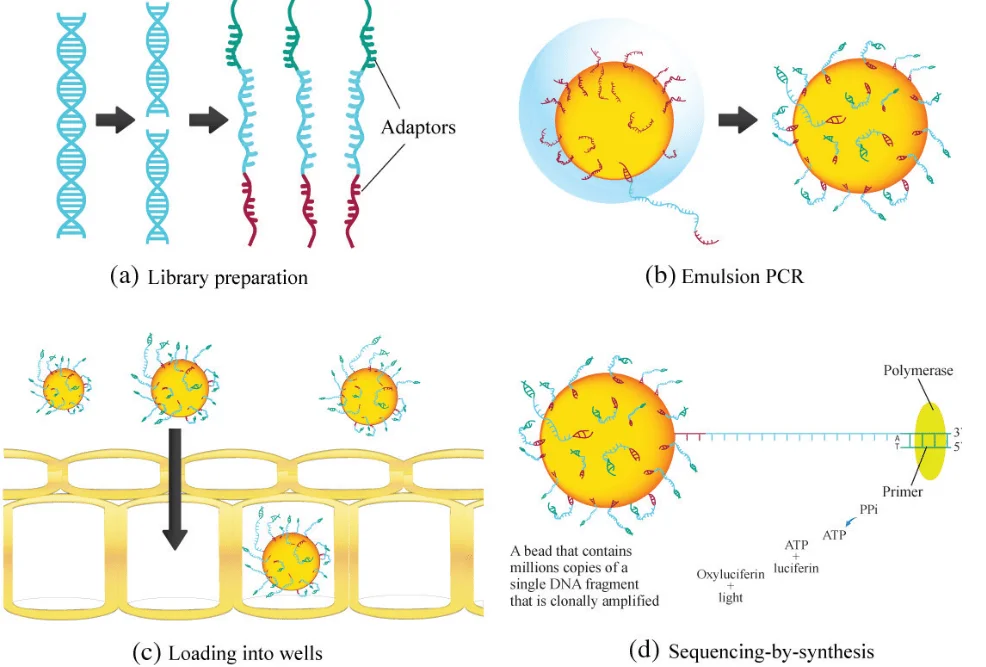
Na tecnolgia da ilumina, devido o processo da pcr em ponte, é gerado fragmentos no sentido 5' -> 3' e 3' -> 5', os quais são sequenciados, porém um sentido de fita de cada vez. Uma vez que temos os **clusters** é adicionados os nucleotídeos especiais, eles possuem um floróro com as cores das bases, semelhante ao sequenciamento de primeria geração, os quais eles florecem dentro dos clusteres e param a plimerização pela enzima Uma vez que a florecência é detectada, o bloqueio e a florecencia da base complementar a fita sequênciada é excluida da reação, possibilidando assim a adição de uma nova base e continuando a adição de nucleotídeos e sequenciando todo o fragmento.



Florecência de clusteres

## Amplificação -> Thermo-fisher

A tecnologia de amplificação da thermo fisher é baseada em também uma pcr porém uma pcr em emulção esta pcr separa os fragmentos por missela. ou seja a ideia é separar apenas um fragmento e coloca-lo dentro de uma missela, junto com todos os materiasi necessários para sua amplificação. Em tubo com milhoes de misselas, dentro de cada uma o fragmento será amplificado preso a uma bead uma bolinha a qual têm centenas de primeres presos na sua superfície.



Amplificação da thermo ficher

## Seqênciamento -> Thermo Fisher

Todas essas beads serão inseridas em um chip com 11 milhões de poços, os quais so cabem uma bead por poço. O sinal detectado pela maquina é a variação de Ph que é criado quando um nucleotídeo é incorporado pela dna polimeraze, sempre que acontece essa incorporação é liberado uma molécula de pirofostato e um atomo de hideogenio. o quê é detectável pela maquina. Isso é possivel pois a maquina consegue tira e botar um nucleotídeo por vez

![Incorporação de nucçeptídeo](data:text/html; charset=ISO-8859-1;base64,)

Incorporação de nucçeptídeo

![Sequênciamento Thermo ficher](data:text/html; charset=UTF-8;base64,)

Sequênciamento Thermo ficher