

Công nghệ Avidity Sequencing

Công ty TNHH Khoa Học Hợp Nhất (United Scientific)

Ngày 09 tháng 06 năm 2024

Trình bày: PHẠM CÔNG SƠN – Kinh doanh kỹ thuật



Công nghệ Avidity Sequencing

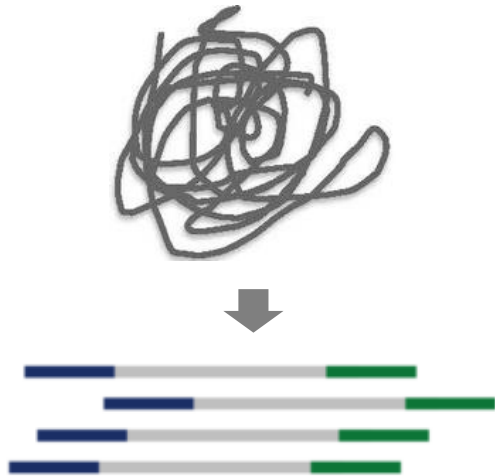
Quy trình Avidity Sequencing

1. Chuẩn bị thư viện

2. Tạo polony (cluster)

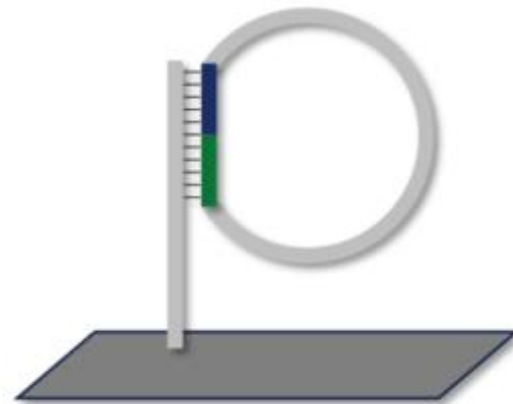
3. Giải trình tự

On benchtop

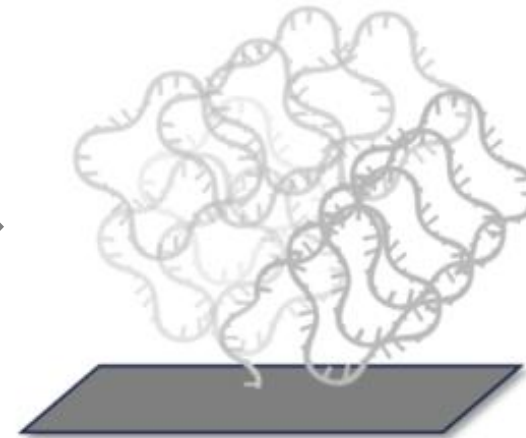


1 bản sao

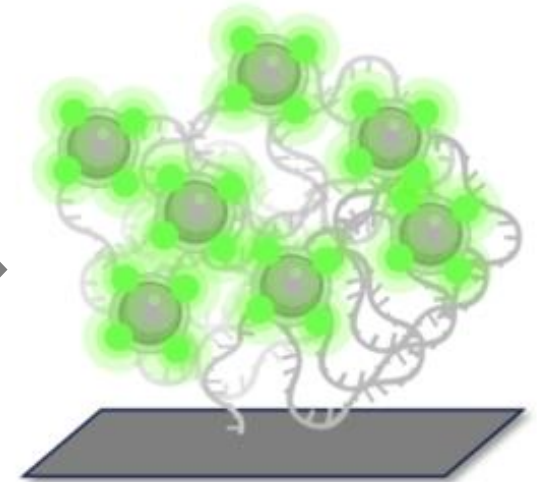
On AVITI



1 bản sao



~1000 bản sao

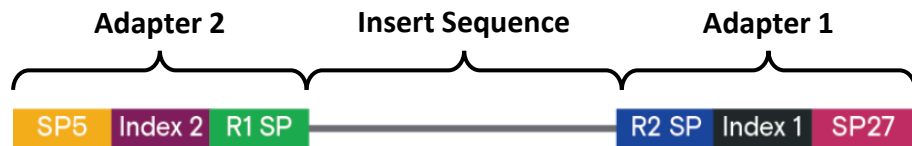


1. Chuẩn bị thư viện

Thư viện là gì?

- Thư viện là tập hợp các đoạn DNA/cDNA có cấu trúc phù hợp để có thể giải trình tự

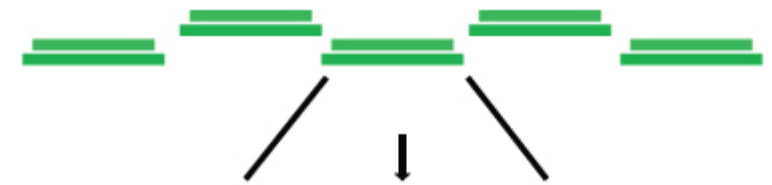
Cấu trúc thư viện



- SP5 và SP27**
Giúp đóng vòng và tạo polony trên flow-cell
- R1 SP và R2 SP**
Vị trí bắt cặp mỗi giải trình tự
- Index 1 và Index 2**
Giúp phân biệt giữa các mẫu
- Insert Sequence**
Đoạn trình tự DNA/cDNA cần giải

Quy trình chuẩn bị thư viện cơ bản

1. Fragmentation



2. End Repair



3. dA Tailing



4. Adapter Ligation



5. Size Selection

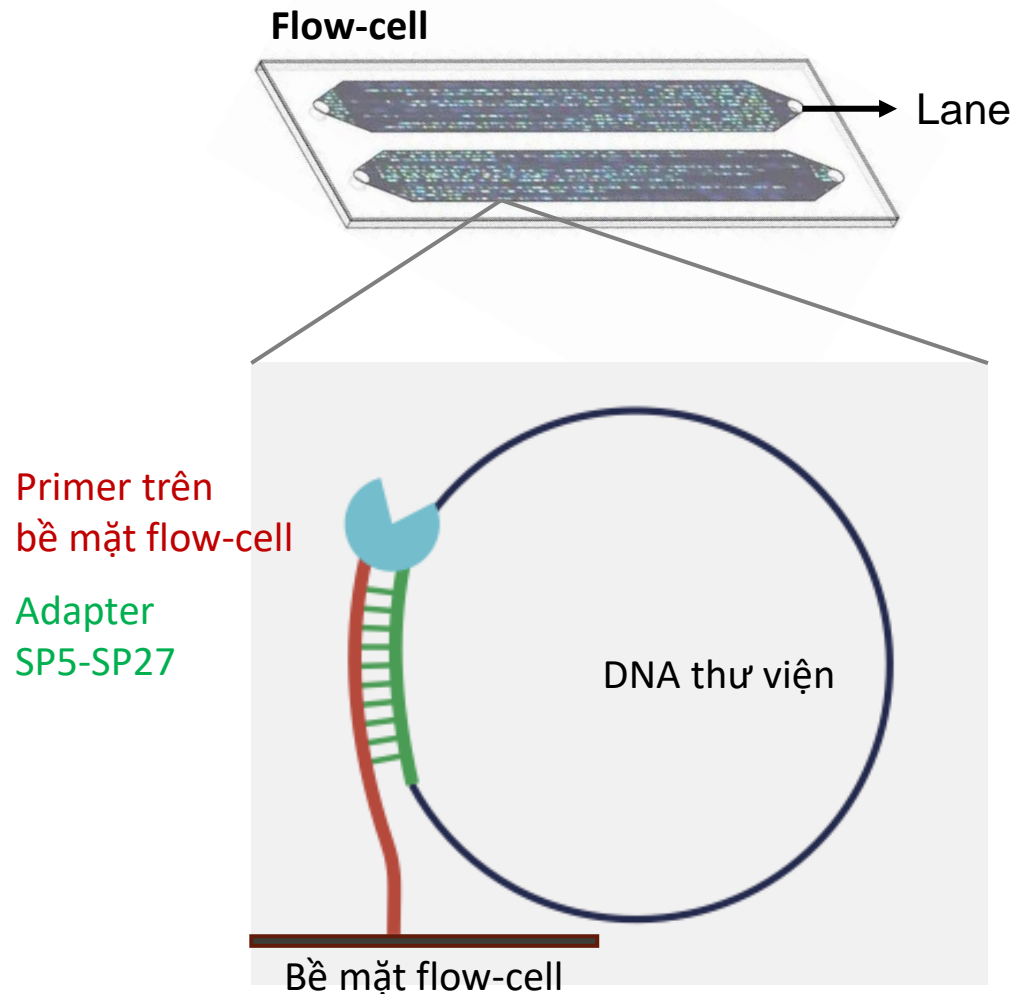


6. Amplification

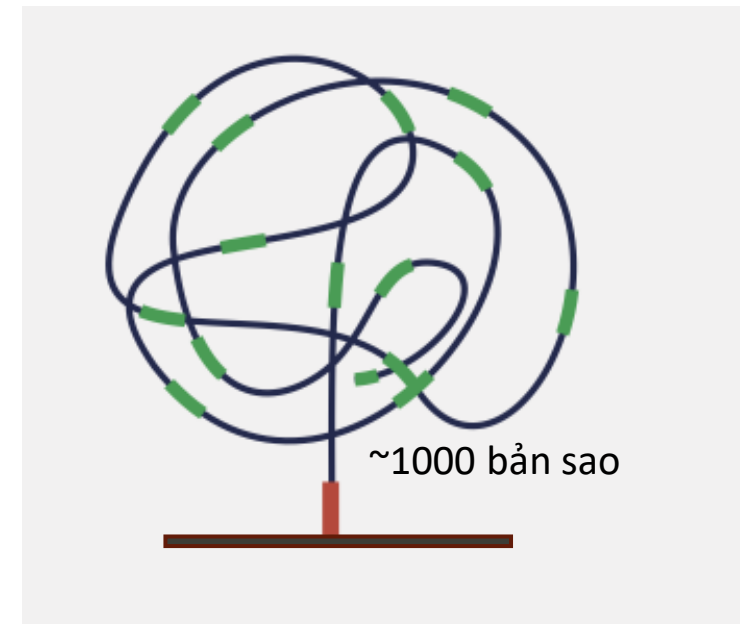


2. Tạo polony (cluster)

Sử dụng khuếch đại xoay vòng (RCA)



| Kiểu khuếch đại | RCA | PCR |
|-------------------------|-----------------------------|--------------------------|
| Hiện tượng GC bias | Không | Có |
| Lan truyền lỗi sao chép | Không (sao chép bản gốc) | Có (sao chép bản sao) |



3. Giải trình tự

Chu kỳ giải trình tự

1 chu kỳ ⇔ 1 nucleotide mỗi polony

(đa số công nghệ NGS, bao gồm avidity sequencing)

| Chu kỳ | 1 | 2 | 3 | ... | n |
|----------|---|---|---|-----|---|
| Polony 1 | A | T | G | ... | C |
| Polony 2 | C | G | A | ... | T |

$n \leq 300$
Mỗi polony ra 1 trình tự

Mỗi chu kỳ có 2 nhiệm vụ

1. Base Calling (đọc tín hiệu nucleotide)
2. Incorporation (tổng hợp 1 nucleotide)



Avidity Sequencing

- 2 nhiệm vụ ⇔ 2 phân tử (avidite + 3'-blocked dNTP)
- Tối ưu từng bước: giảm chi phí, tăng chất lượng

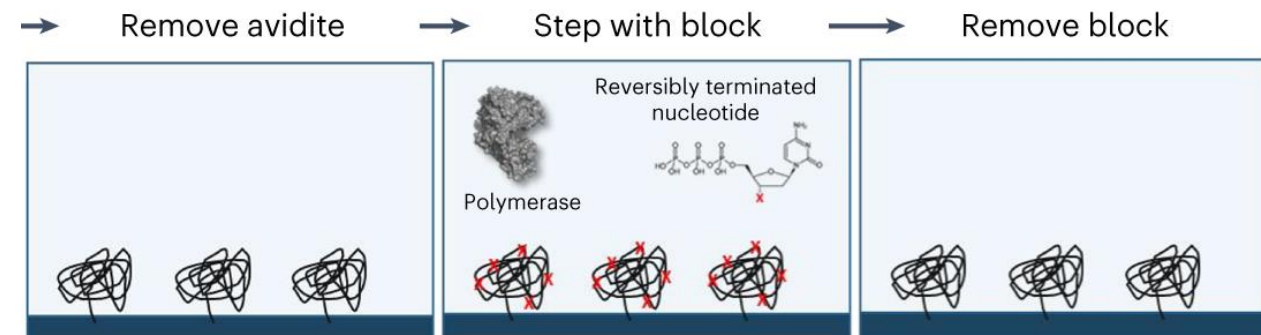
Avidity Sequencing Cycle

Arslan, Sinan, et al. ["Sequencing by avidity enables high accuracy with low reagent consumption."](#) *Nature biotechnology* 42.1 (2024): 132-138.

Base Calling (Avidite) ⇔ Giảm 100-lần yêu cầu [dye]



Incorporation (3'-blocked dNTP)

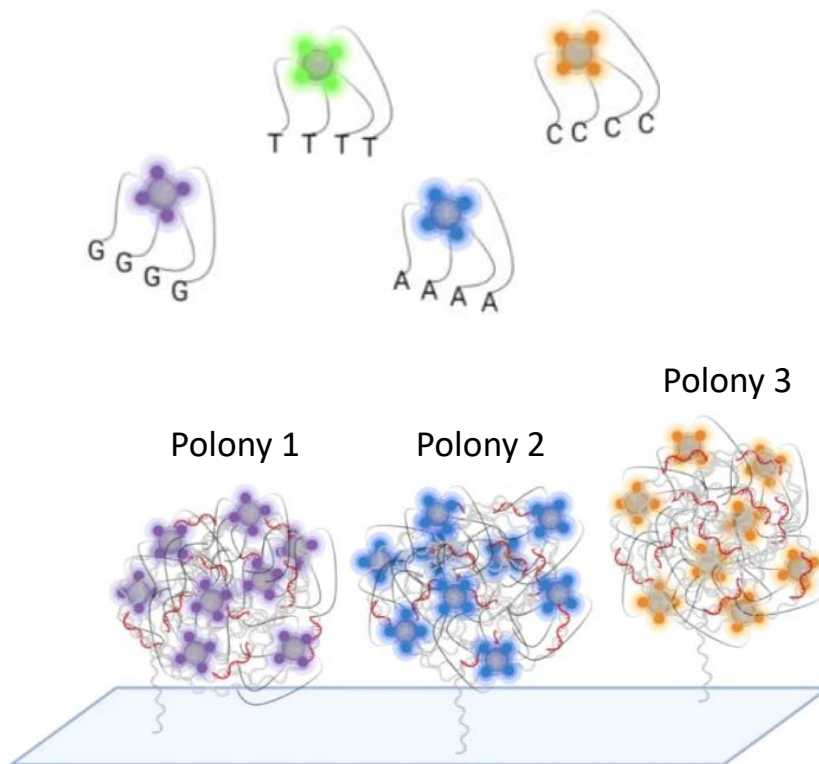


3. Giải trình tự

Phân tử Avidite

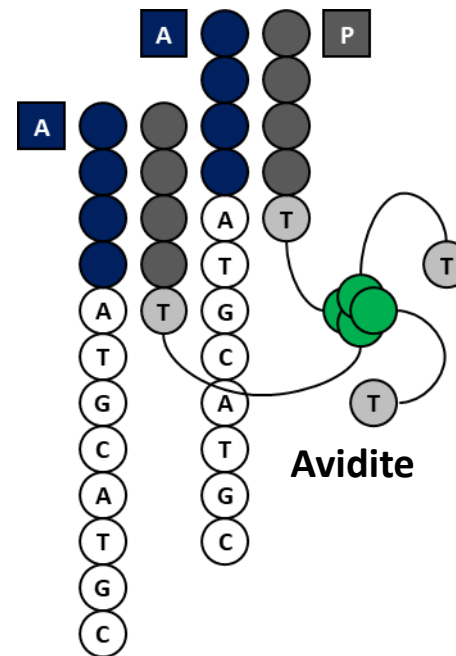
Cấu trúc hình “bạch tuộc” / “nhện”

- Lõi gắn huỳnh quang
- Mỗi chân gắn 1 nucleotide (cùng loại)



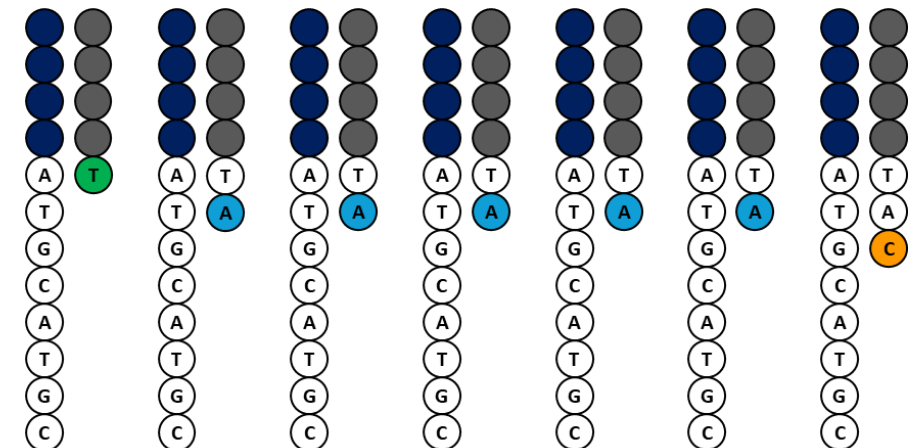
Bám đồng thời nhiều vị trí

1. Tăng cường ái lực, ổn định
2. Che lấp phasing/pre-phasing



Phasing

Pre-phasing



Mô tả bộ dữ liệu (dataset)

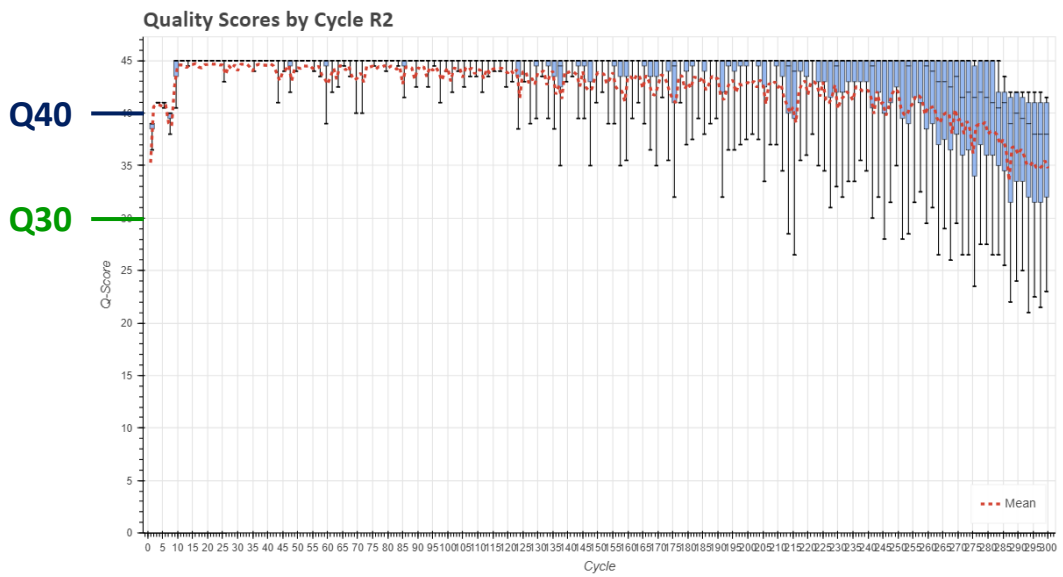
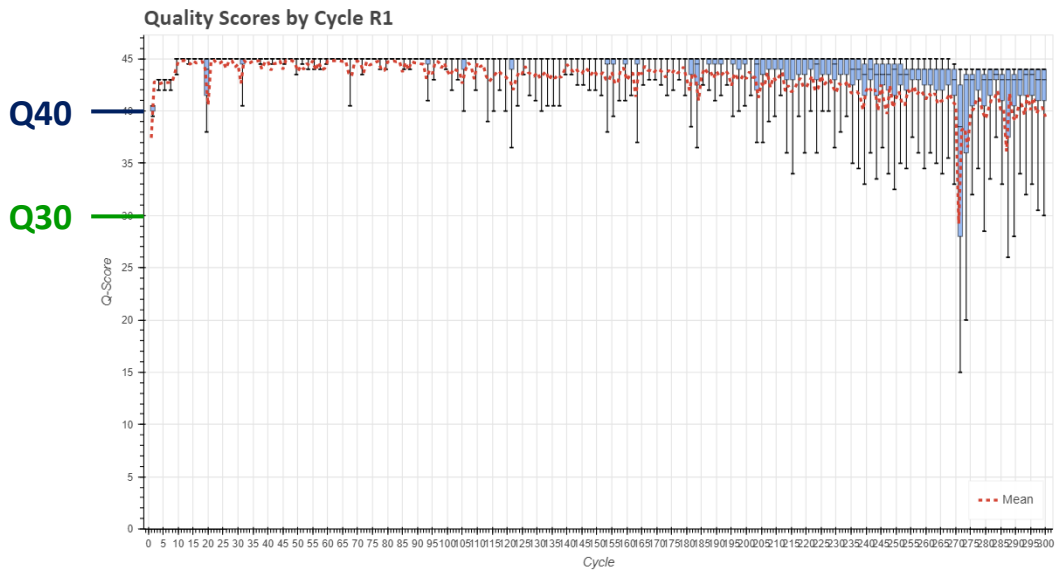
- **Mục tiêu**
Giải trình tự 16S Amplicon (V3-V4)
- **Mẫu chuẩn**
ZymoBIOMICS Microbial Community DNA Standard
- **Chuẩn bị thư viện**
KAPA HiFi HotStart ReadyMix
+ IDT xGen indexing primers
- **Giải trình tự Avidity**
Cloudbreak Freestyle 2 x 300

| Q-score | Độ chính xác |
|---------|--------------|
| Q30 | 99.9% |
| Q40 | 99.99% |

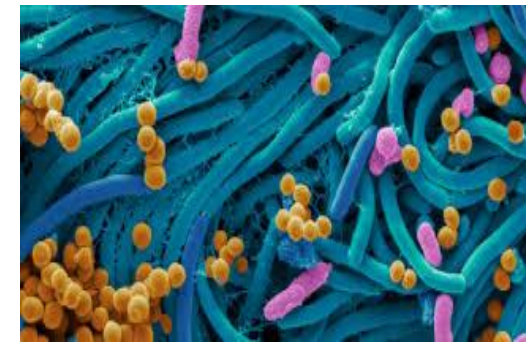
Kết quả Avidity Sequencing

- **Polony:** 436,350,631

| | Mean Q | Q30 | Q40 |
|--------|--------|-------|-------|
| Read 1 | 43.0 | 96.2% | 90.8% |
| Read 2 | 42.3 | 94.6% | 85.4% |



- Microbial WGS
- Virus sequencing
- 16S / 18S
- Metagenome assembly





Giải pháp Element LoopSeq

Quy trình LoopSeq

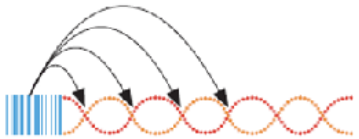
Nguyên lý: Synthetic Long Read (SLR) sử dụng barcode để liên kết dữ liệu các đoạn ngắn để lắp ráp đoạn dài ban đầu



1. Gắn barcode
từng đoạn dài



2. Khuếch đại (PCR)



3. Phân phối barcode



4. Giải trình tự
short-read 2x150



5. De novo assembly
tạo SLR theo barcode

Ứng dụng của LoopSeq

- Full-length 16S / 18S
- RNA Isoform
- Immune Repertoire (full-length TCR/BCR)
- Long Amplicon Phasing (lên đến 6kb)

Ưu điểm của LoopSeq

- **Độ chính xác cao**
Mỗi SLR đều tương đương 1 consensus sequence
- **Hiệu quả kinh tế**
Giải trình tự SLR ngay trên hệ thống NGS (short-read)

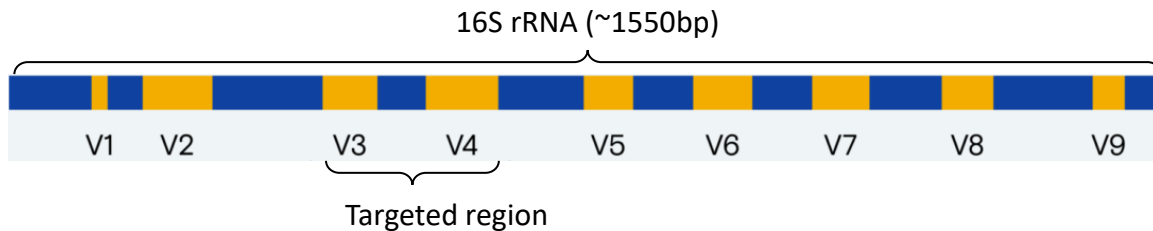


1 SLR = 1 consensus sequence

Nhu cầu phân tích full-length 16S

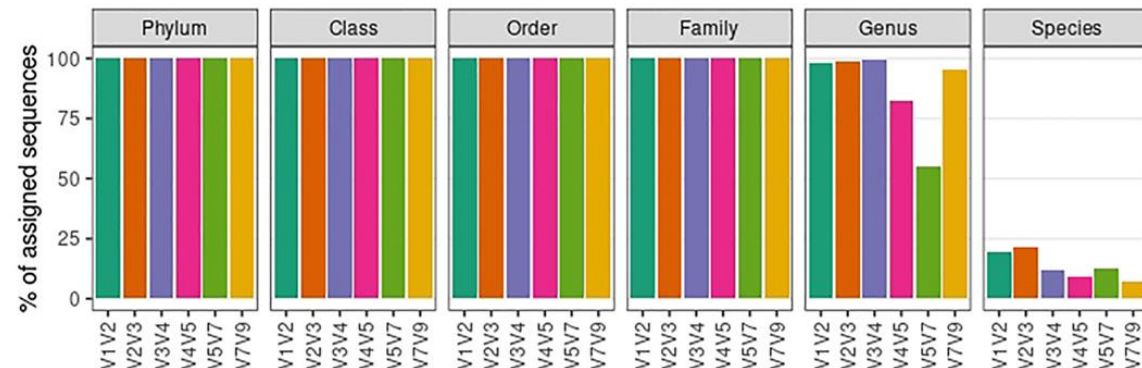
Cấu trúc 16S rRNA

 Vùng biến động cao (V)  Vùng bảo tồn cao



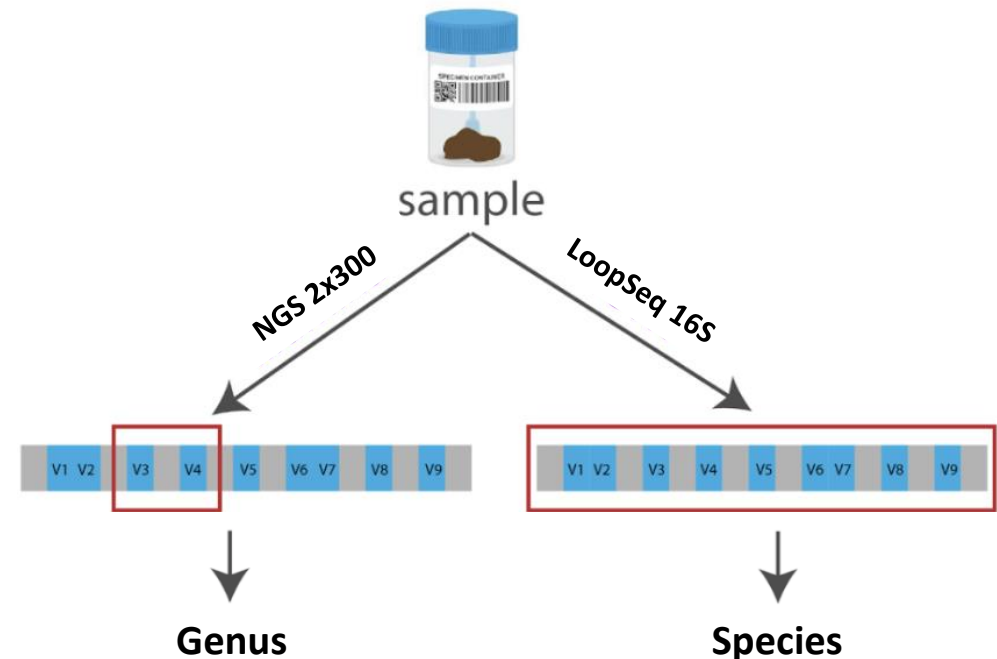
Vấn đề của giải trình tự 1 phần 16S

Heidrich, Vitor, et al. "[Choice of 16S ribosomal RNA primers impacts male urinary microbiota profiling.](#)" *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 12 (2022): 862338.

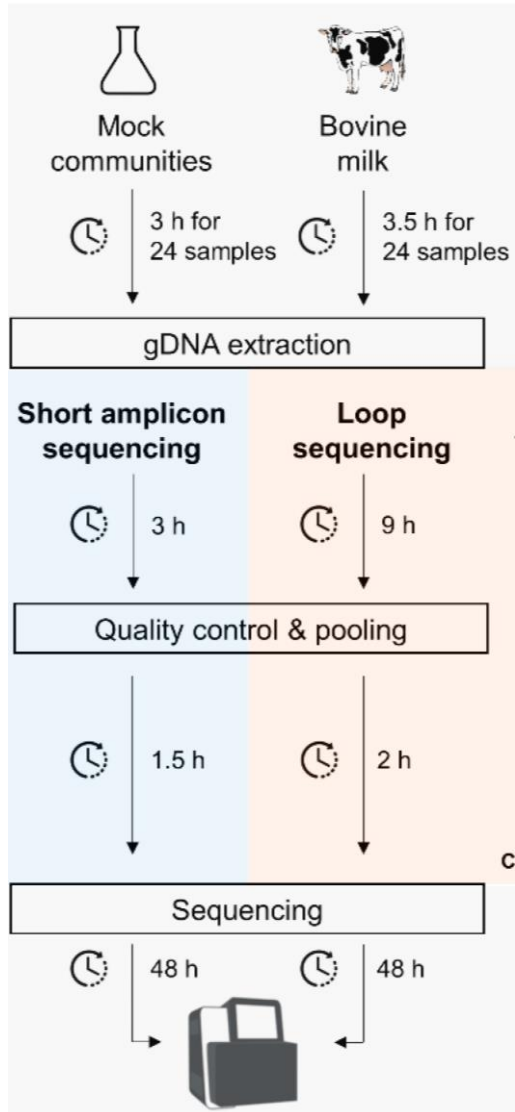


Giải pháp LoopSeq 16S

- **Mục tiêu**
Giải trình tự full-length 16S rRNA
- **Ưu điểm**
 - Giải trình tự long-read trên hệ thống short-read
 - Synthetic Long Read (SLR) cung cấp độ chính xác cao

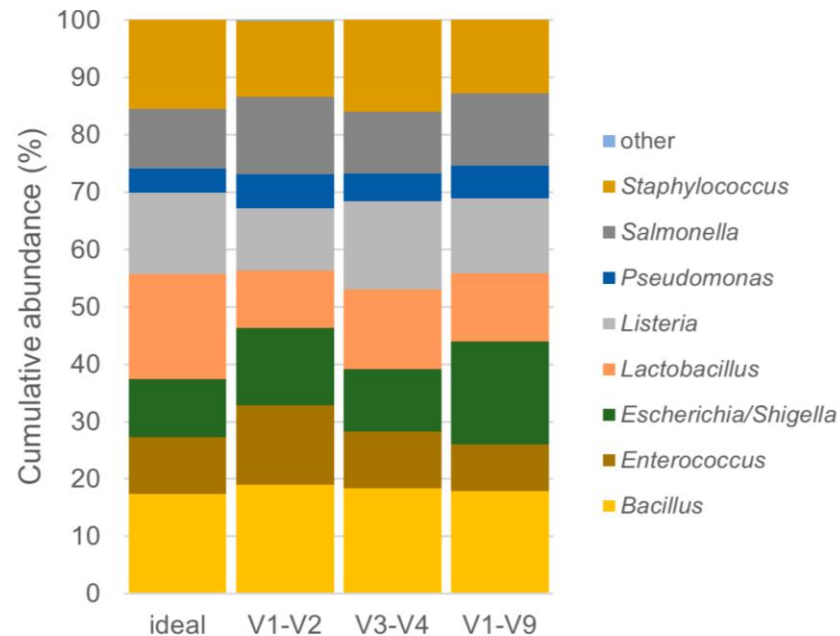


Phân tích mẫu chuẩn với LoopSeq 16S



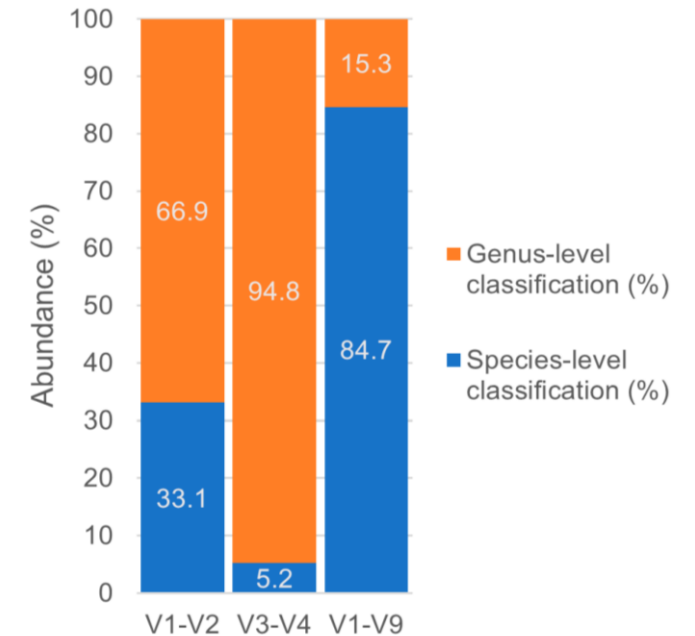
Taxonomic

- Zymo Mock (8 vi khuẩn + 2 nấm)
- V1-V2 và V3-V4: 1 phần 16S (short-read)
- V1-V9: Full-length 16S sử dụng LoopSeq



Phân loại mức loài

- V1-V2: 33.1% read
- V3-V4: 5.2% read
- V1-V9: 84.7% read (LoopSeq)



Abellan-Schneyder, Isabel, et al. ["Full-length SSU rRNA gene sequencing allows species-level detection of bacteria, archaea, and yeasts present in milk." Microorganisms 9.6 \(2021\): 1251.](#)

- **Tạo polony**
Sử dụng khuếch xoay vòng (RCA)
- **Chu kỳ giải trình tự**
Tách riêng 2 nhiệm vụ, base calling sử dụng avidite
- **Chất lượng dữ liệu**
Dữ liệu chất lượng Q40+, gấp 10 lần tiêu chuẩn Q30
- **Element LoopSeq 16S**
Giải trình tự full-length 16S, phân tích dữ liệu mức loài



THANK YOU

