

# Биоинформатика



## Секвенирование нового поколения **(NGS)**



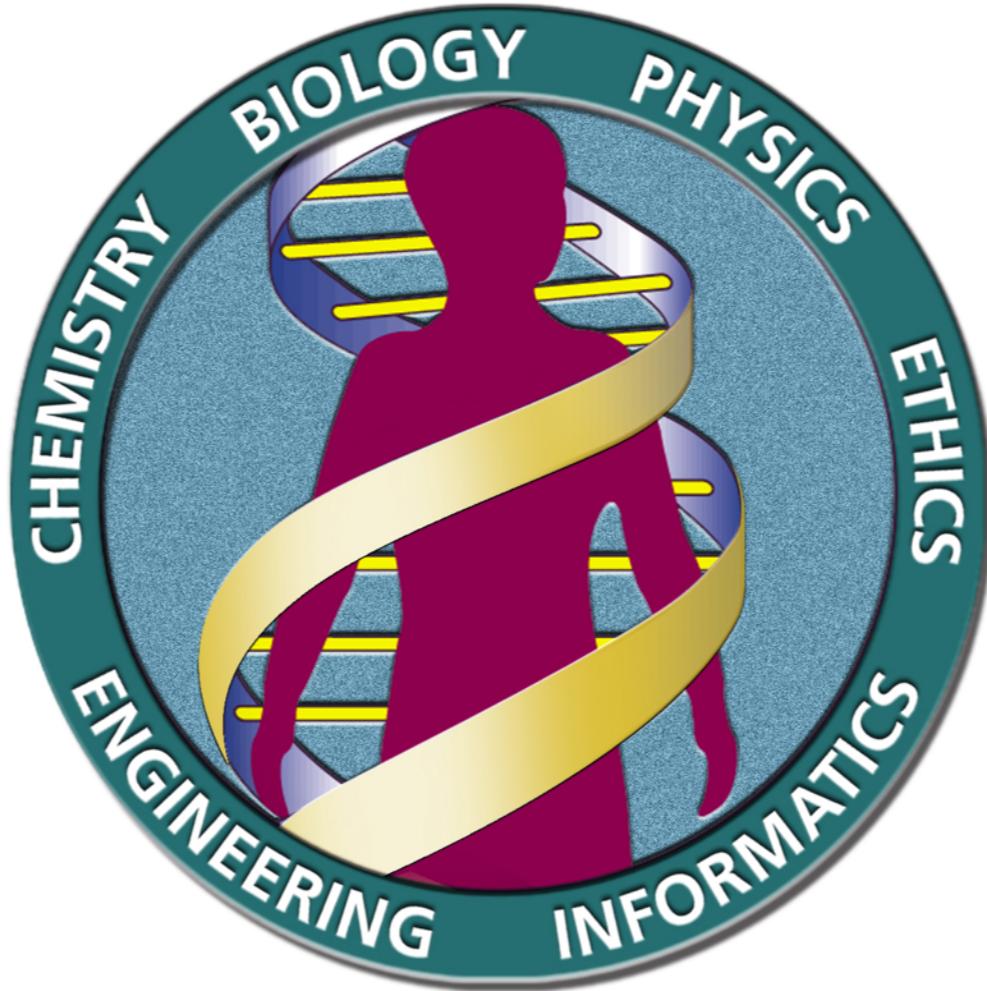
Истина

Герасимов Евгений Сергеевич



ВКонтакте





The **Human Genome Project** (HGP) was one of the great feats of exploration in history - **an inward voyage of discovery** rather than an outward exploration of the planet or the cosmos; an international research effort to sequence and map all of the genes - together known as the genome - of members of our species, *Homo sapiens*. Completed in April 2003, the HGP gave us the ability, for the first time, to read nature's complete **genetic blueprint for** building **a human being**.

# Проекты-конкуренты

IHGSC

(Фрэнсис Коллинз)

Проект ведется под NIH

Анонимные доноры, открытость  
данных

Разработали стандарты качества  
секвенирования

Проект положил начало таким  
проектам, как ENCODE, 1000  
геномов, НарМар

Nature

Крейг Вентер

Работал в NIH, занимался мРНК,  
ввел EST

Президент Celera Genomics

Основатель TIGR

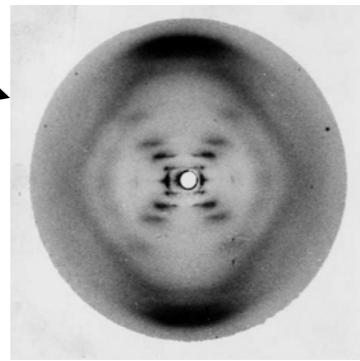
Создатель Синтии (первого  
биосинтетического организма)

Создатель первого ассемблера и по  
сути первого метода NGS

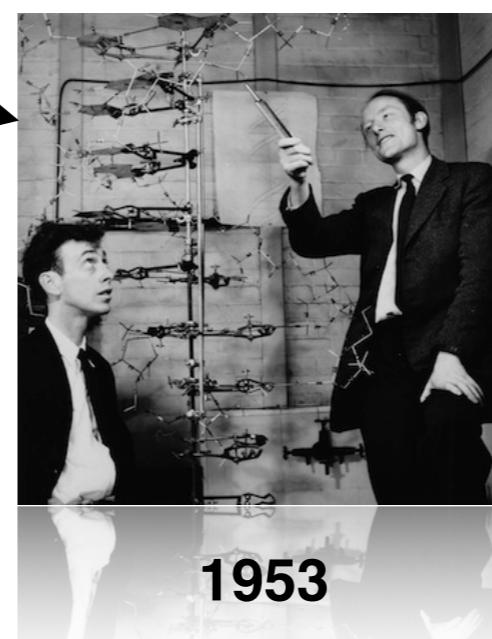
Science



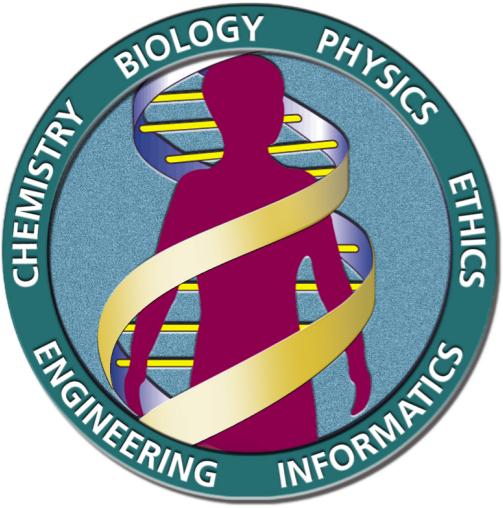
1865



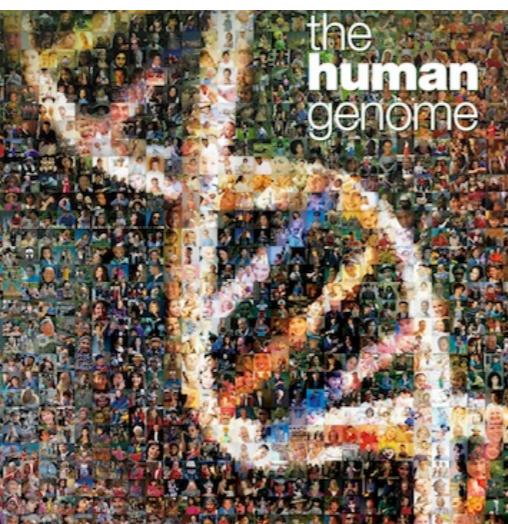
1952



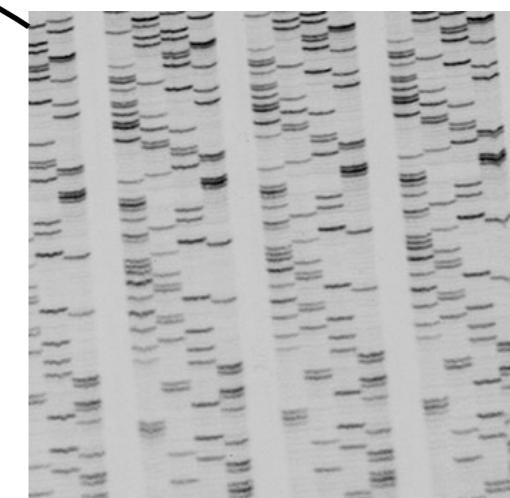
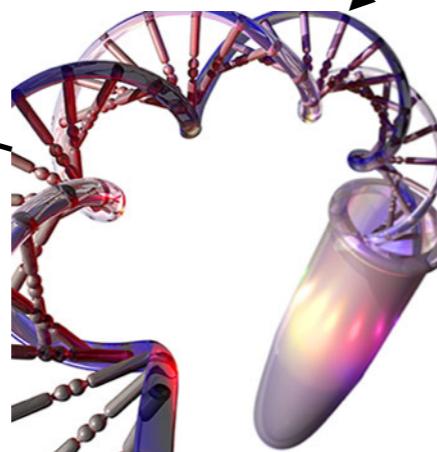
1953



1990



1983



1977

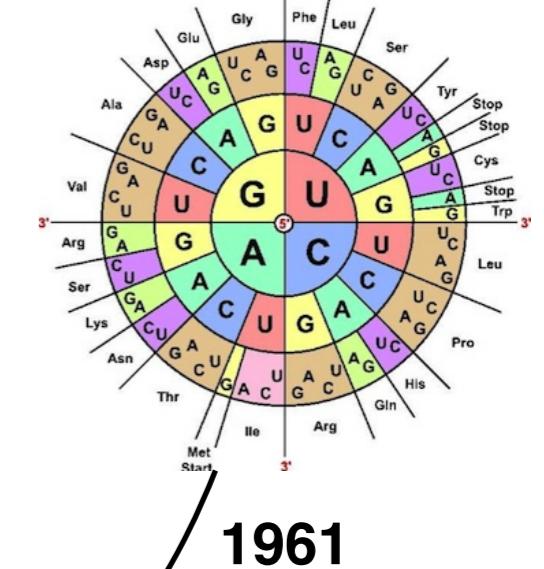
NGS

>2010



2001

from <https://unlockinglifescode.org/timeline>



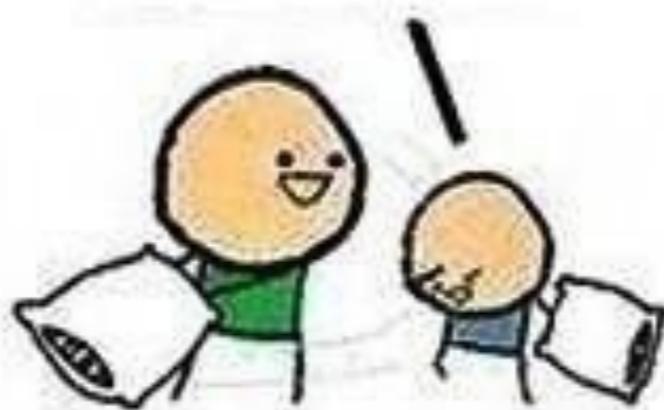
1961

# Проект "Геном человека"

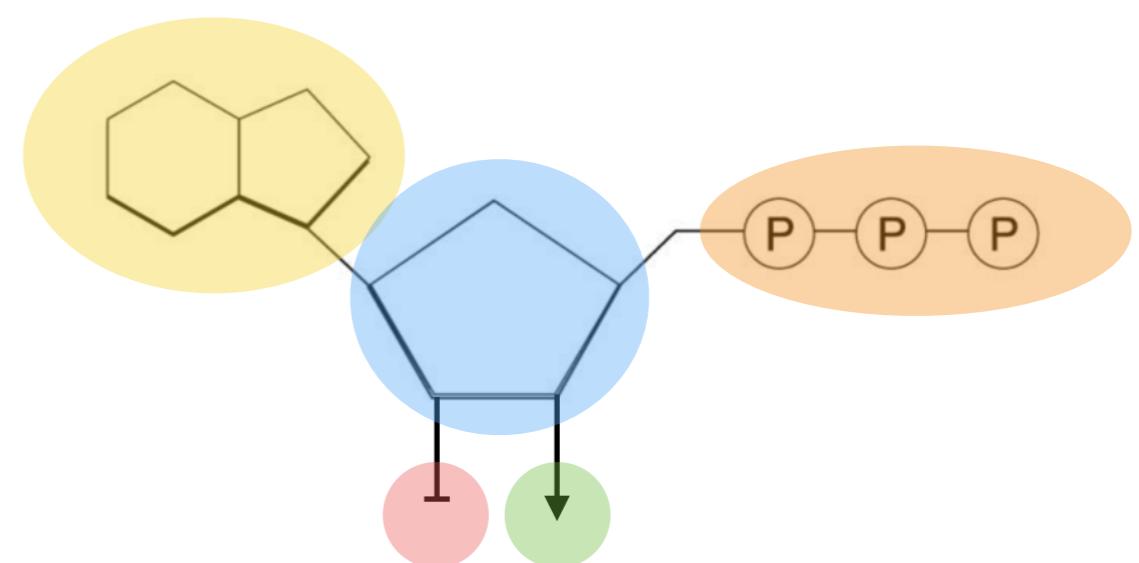
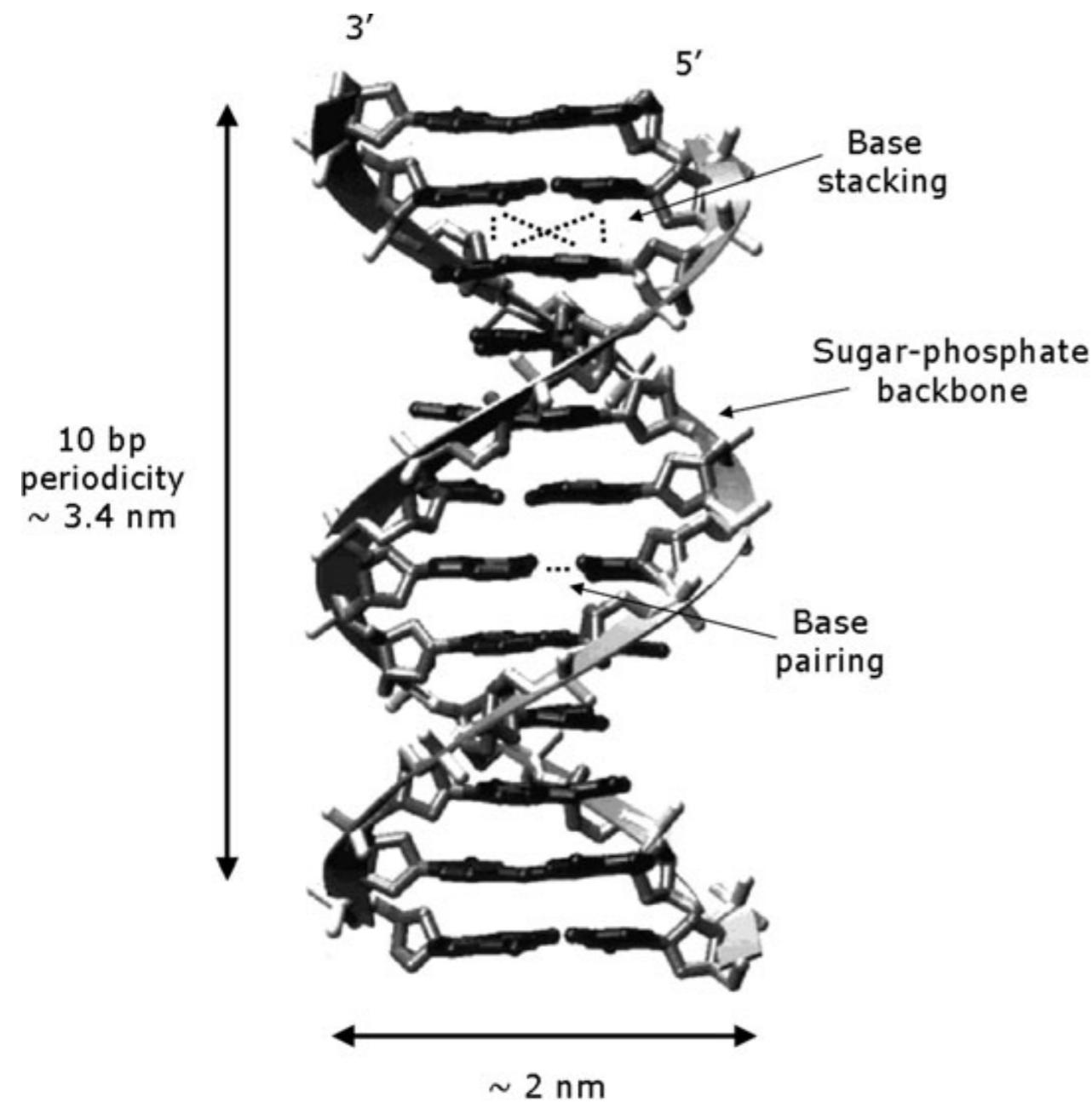
25 тысяч генов



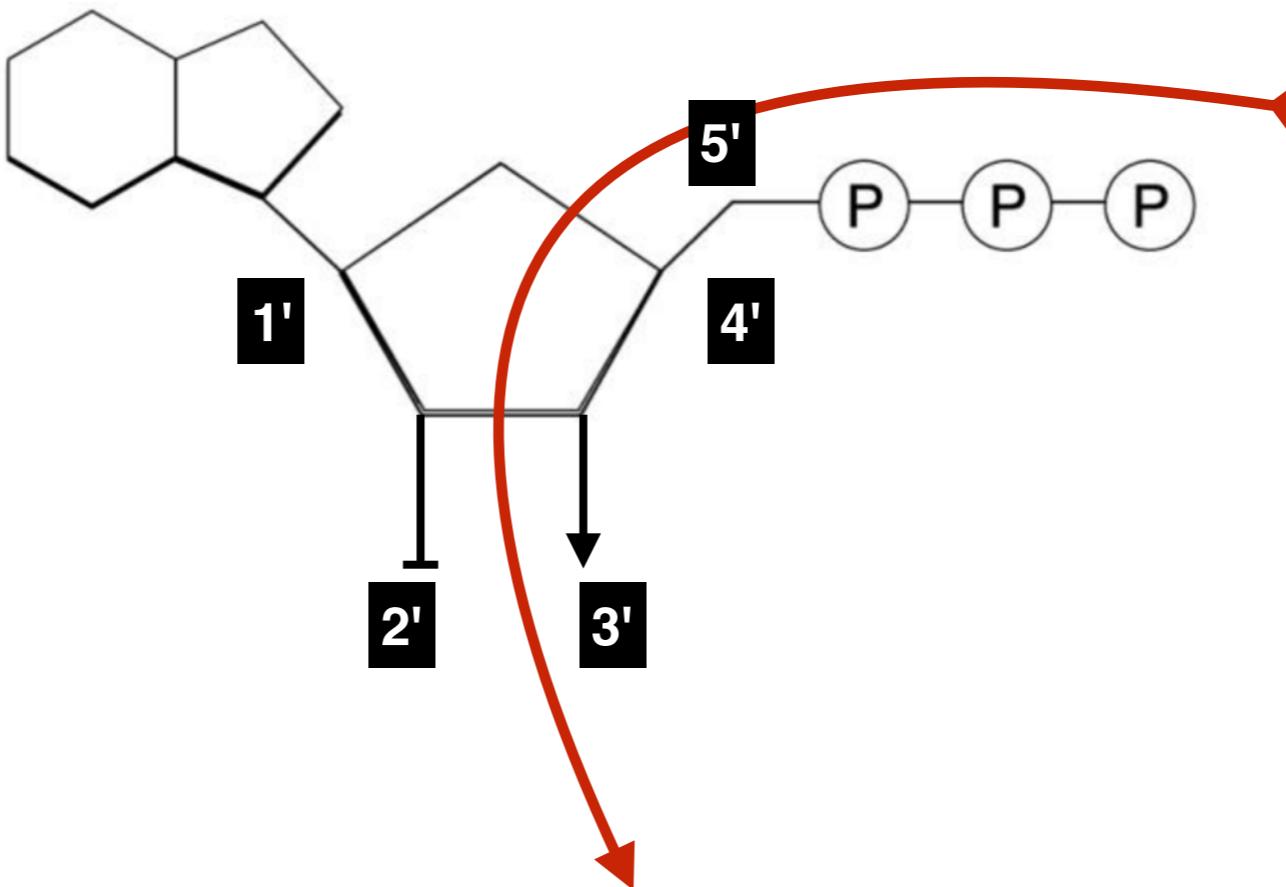
геном человека полностью  
отсеквенирован



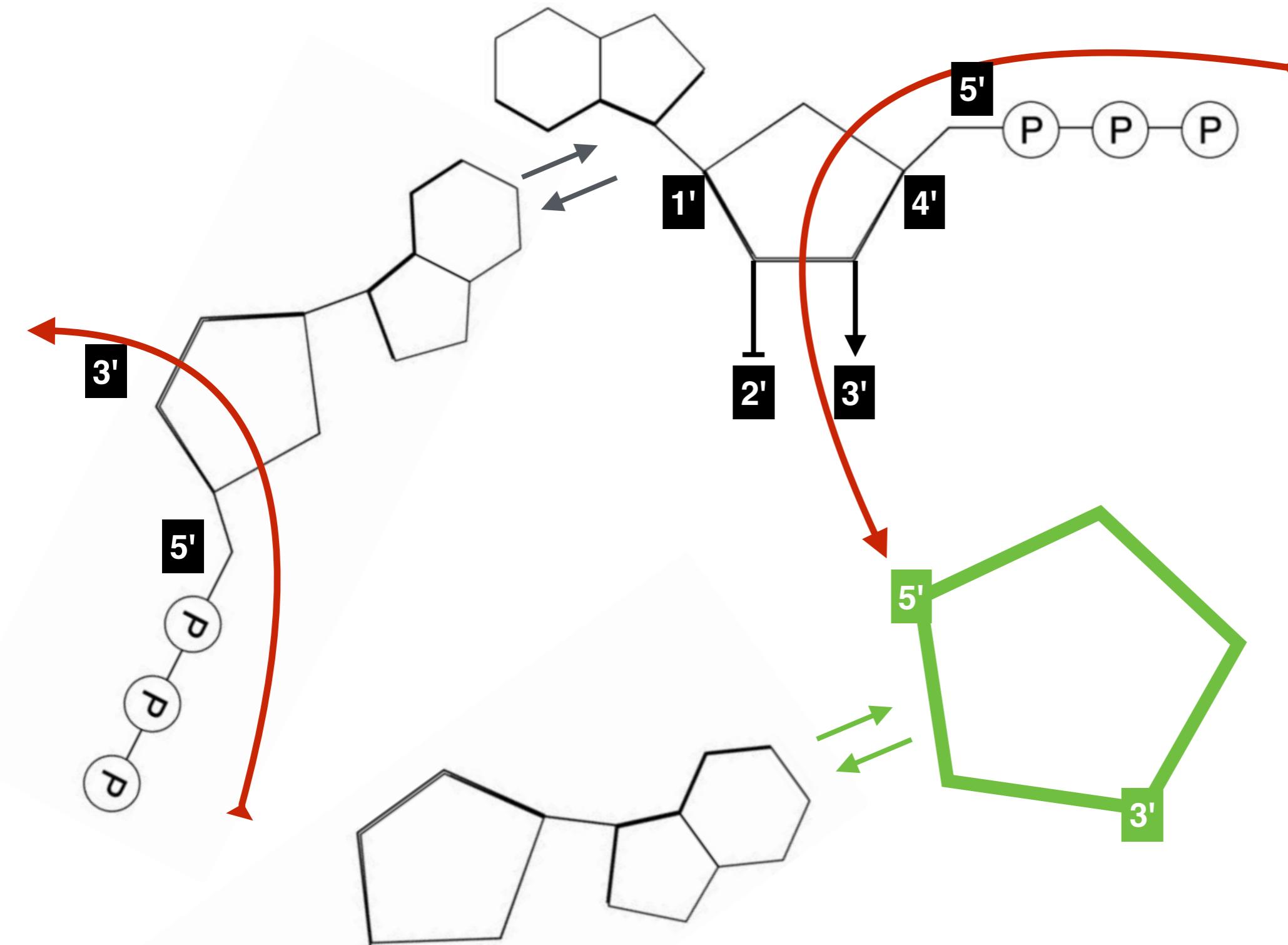
# Структура ДНК



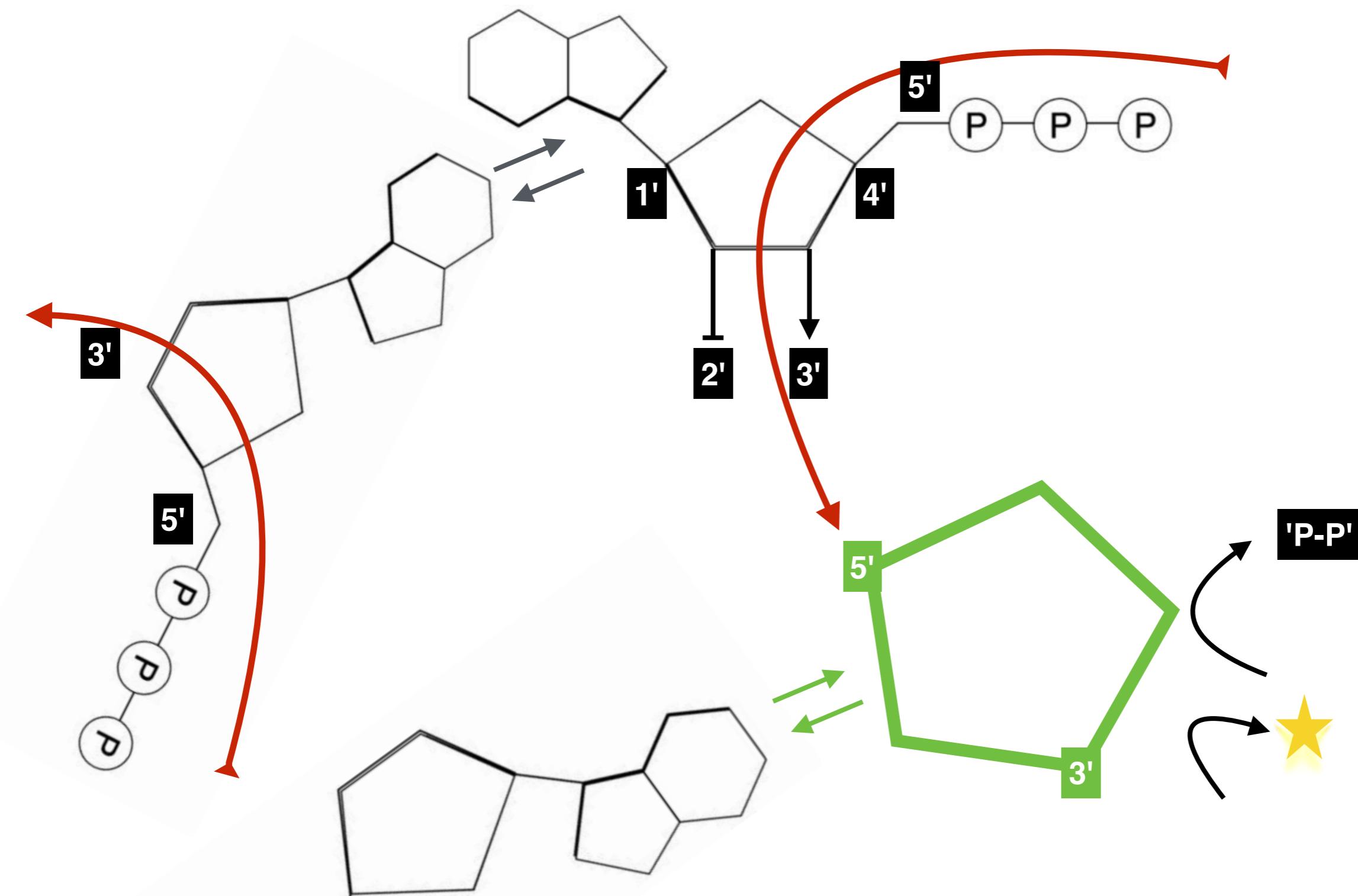
# Нуклеотид в цепи



# Полимеразная реакция



# Включение нуклеотида

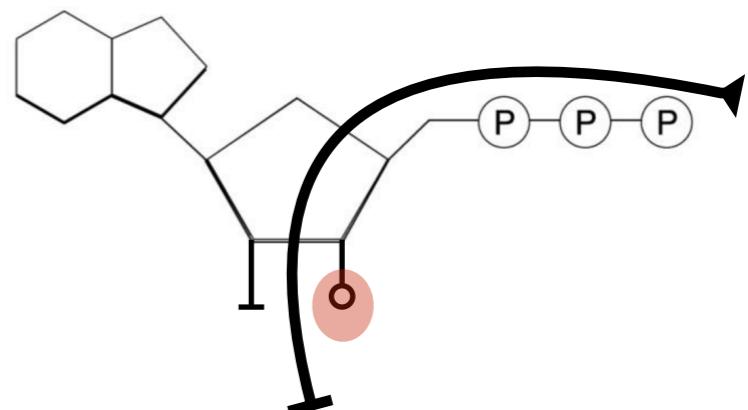


# ”По Сэнгеру”

## ДНК секвенирование первого поколения

- Исторически **первый** метод секвенирования
- Как и практически все методы секвенирования основан на активности ДНК-зависимой **ДНК-полимеразы**
- В качестве способа детекции сигнала использовался метод **авторадиографии**
- Основан на вероятностном прерывании синтеза цепи в определенной позиции (**ddNTP**)

ddNTP не имеет гидроксила на 3' конце, поэтому продление цепи невозможно



# ”По Сэнгеру”: принцип метода

праймер **AGTC-**  
матрица **■ TCAGATCTAGGTACTG**

The diagram shows a sequencing gel lane with four horizontal bands of DNA fragments. The top band is red, representing ddATP incorporation at the first position. The other three bands are grey, representing no incorporation. To the left, the label "ddATP" is written vertically above the lane. To the right, the sequence "AGTCTAGA" is shown above the first band, "AGTCTAGATCCA" above the second, and "AGTCTAGATCCATGA" above the third.

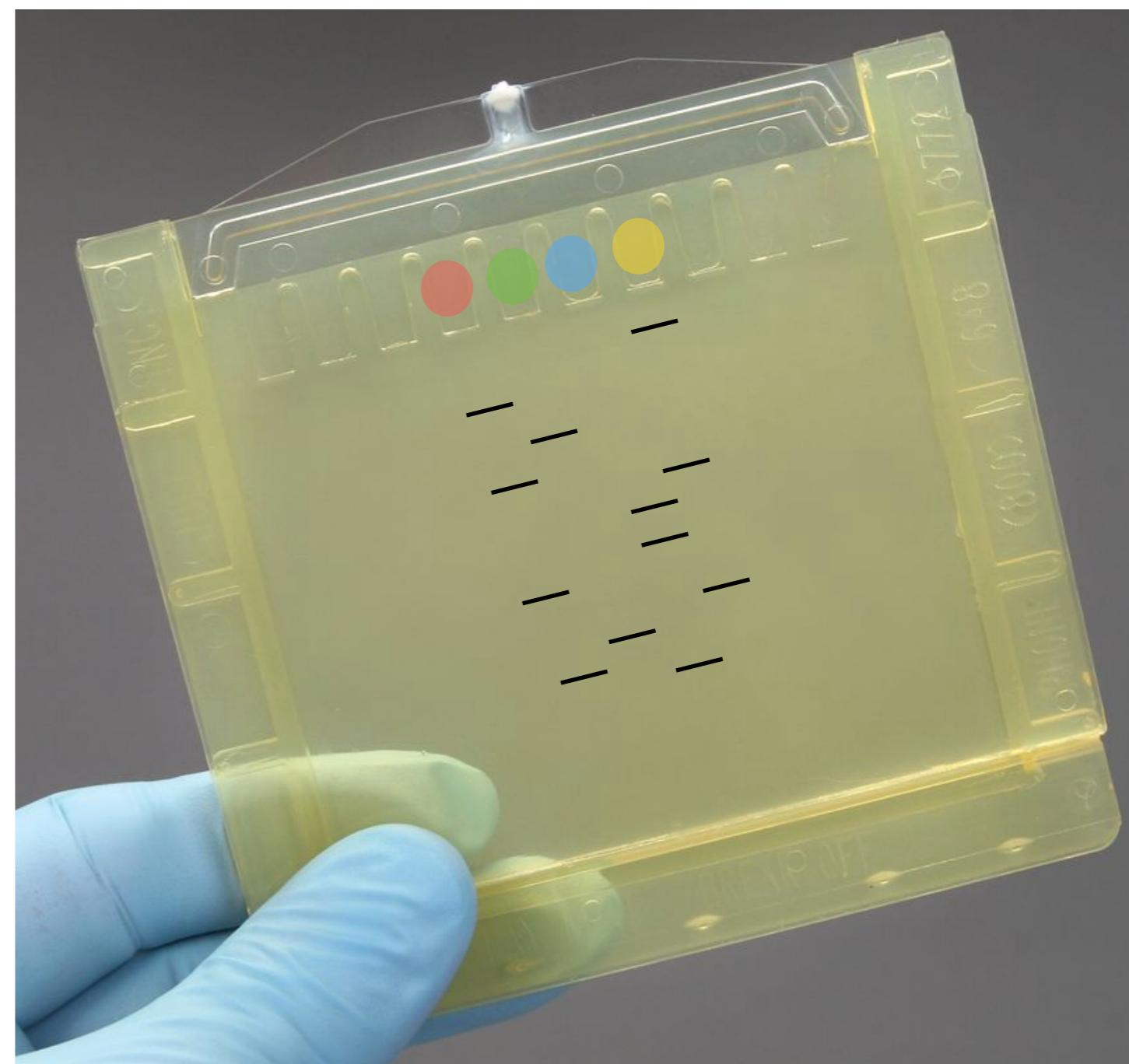
**ddGTP**  AGCTCTAG  
AGTCTAGATCCATG

**ddCTP**  AGTCTAGATC  
AGTCTAGATCC  
AGTCTAGATCCATGAC

**ddTTP**



AGTCT  
AGTCTAGAT  
AGTCTAGATCCAT



# FASTA формат

*A, G, T, C и другие буквы*

>KE147310.1 Leishmania tropica L590 unplaced genomic scaffold  
TCACAAATAACTGTGTCGGCGCATGGCTGTAAGGCGTGTGCCGCCACGGCTGCCGCACCACGCGATGG  
GGTCTGTGACAGGGGGCGAGGCAGTGATCTTGTGTTCTGTGGCGGAATGGCGACATTGAAGGAAAACGT  
AATGACGAGCACCTCCCTACATCTTATAGACATACACGCAAACCTCAGGTTACGCATTAATGATT  
ACGCACTTCTGCTTCTATAATGTTTCAGTGCTTATATGTGTGCGTGTGGTGCAGCGATGTGTGTT  
GCCTCTCTTGTGCTTCTCGTCTGTCGTCTCGCCGTACTGCTATTGACGAAGACGGATGAAAC  
GGTGCCGAAGAGCAAATCGTCCCCTGTTCAAGATCACTGGCTGAAAAGGTCGATAGCTGGAGGGCCGTT  
CGCCGGACTTCGATGCCGCAGTCAGGCCATCGAGAAAAGATCACCCACCAAGATAAGTCCCCTT  
CCTTGAGAGATGCGAATGGCGGAAGTGAGCATCGCGCGATATTAGAGACCCTGCGGCACCAAGCTAC

5' AATGACGAGCACCTCCCTACATCTTATAGACATACACGCAAACCTCAGGTTACGCATTAATGATT 3'  
3' TTACTGCTCGTGGAGGGATGTAGAATATCTGTATGTGCGTTGGAGTCCAATGCGTAATTACTAAG 5'



**reverse & complement**

5' GAATCATTAAATGCGTAACCTGAGGTTGCGTGTATGTCTATAAGATGTAGGGAGGTGCTCGTCATT 3'

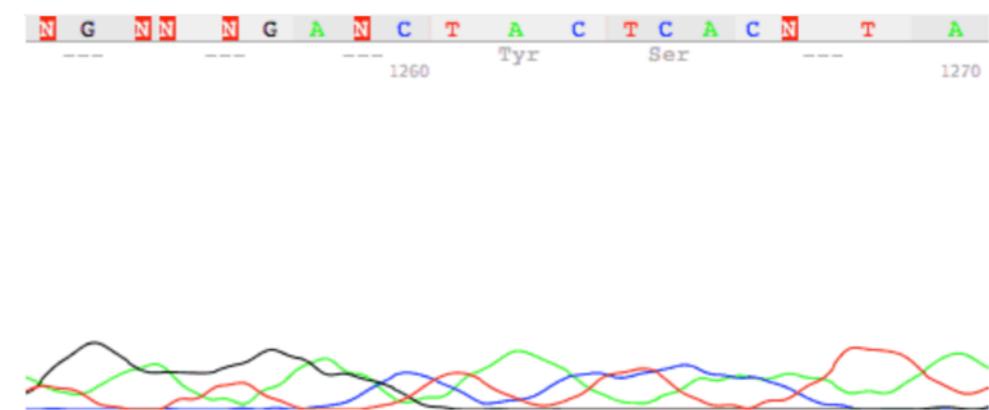
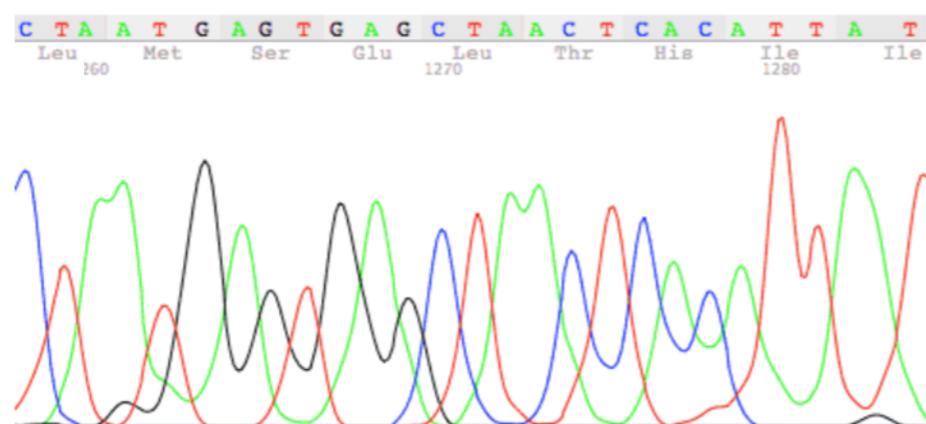
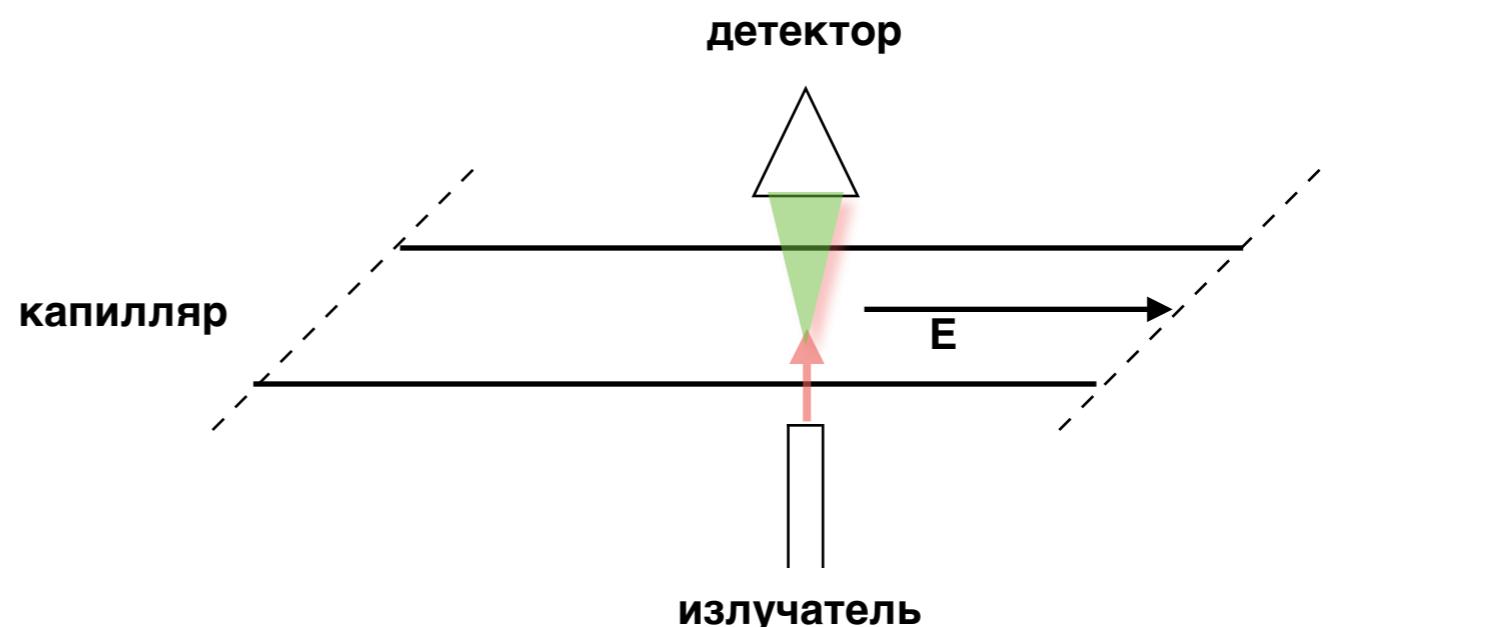
# "По Сэнгеру": 96x



ABI Prism 3100

Автоматизация метода секвенирования методом Сэнгера: капиллярные машины.

Качество прочтения: с какой вероятностью нуклеотид в данной позиции прочитан с ошибкой



# Ошибки секвенирования

## Источники ошибок

### На этапе секвенирования образца

Обусловлены особенностями измерительной системы прибора и технологиями секвенирования

Можно выявить или предсказать.

На механизме предсказания ошибки основано присвоение качества прочтения основания прибором.

### На этапе пробоподготовки

Вызваны присутствием нецелевых молекул в образце, ошибками ферментов (полимеразы)

Нельзя выявить на этапе секвенирования

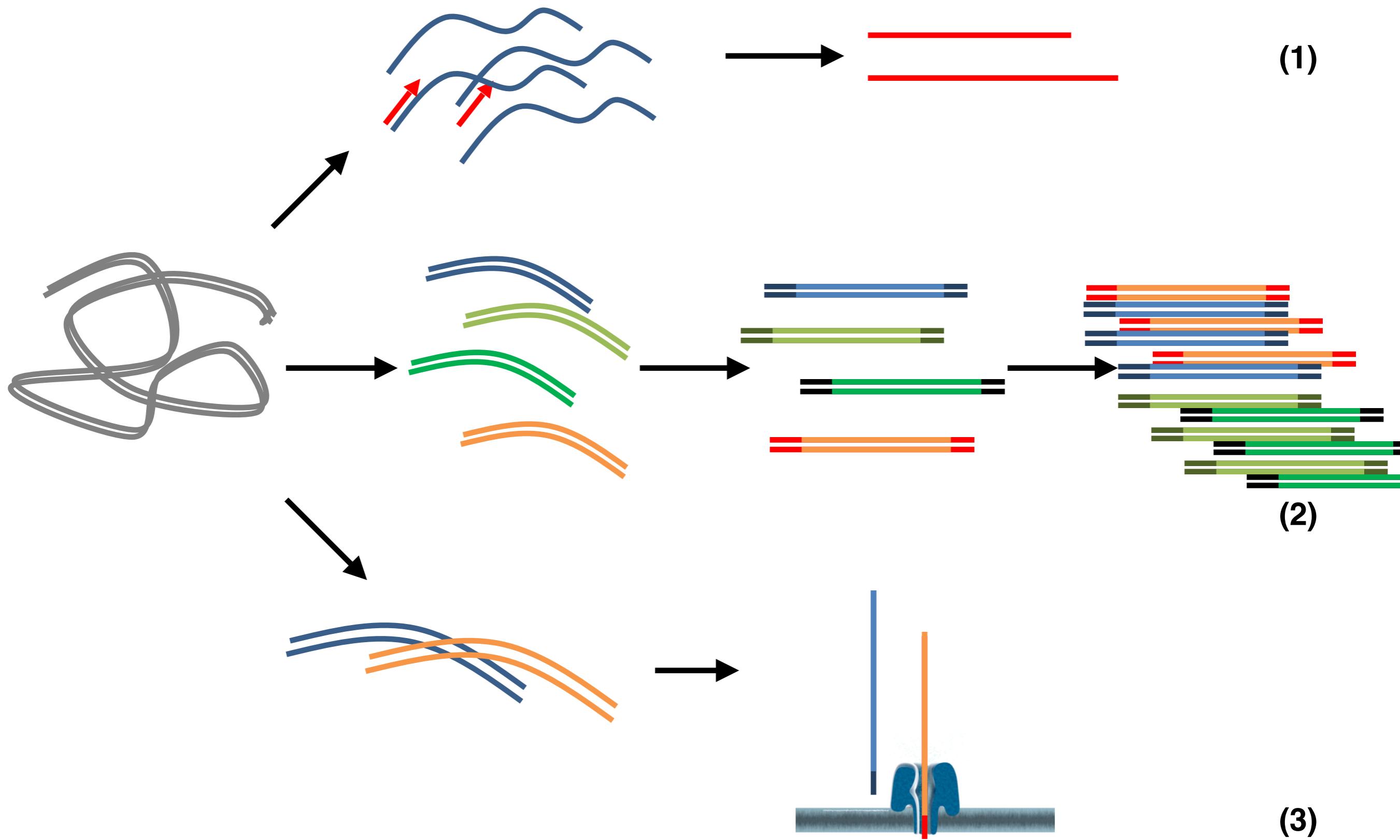
Качество прочтения нуклеотида может быть выражено вероятностью ошибки. Принятый сегодня способ записи **Phred Score (Q)**.

$$Q = -10 \log_{10} P \quad \longrightarrow \quad P = 10^{-\frac{Q}{10}}$$

Phred Quality Score	Probability of incorrect base call	Base call accuracy
10	1 in 10	90%
20	1 in 100	99%
30	1 in 1000	99.9%
40	1 in 10000	99.99%
50	1 in 100000	99.999%

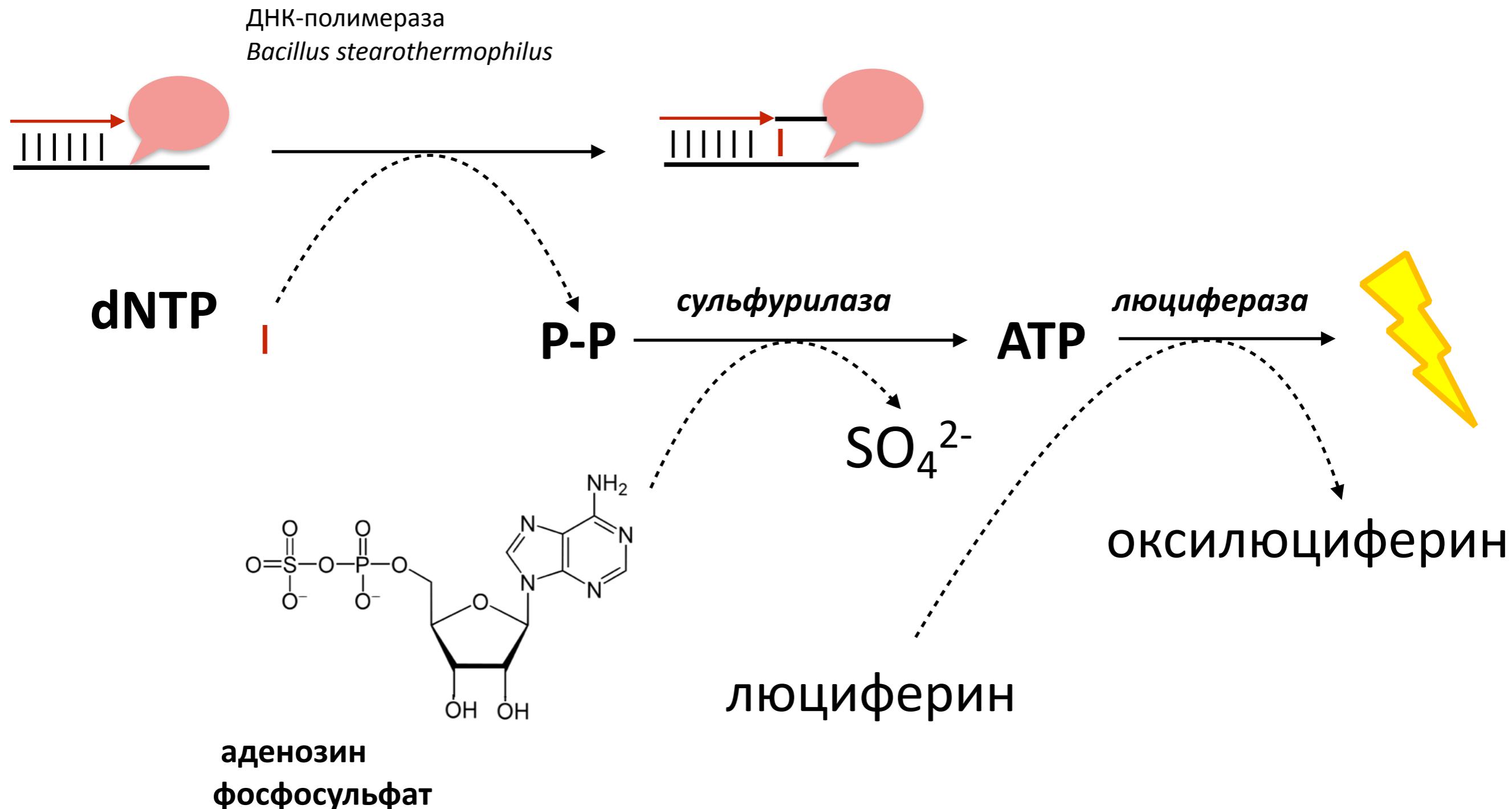
# Теория поколений

быстрее, больше, дешевле

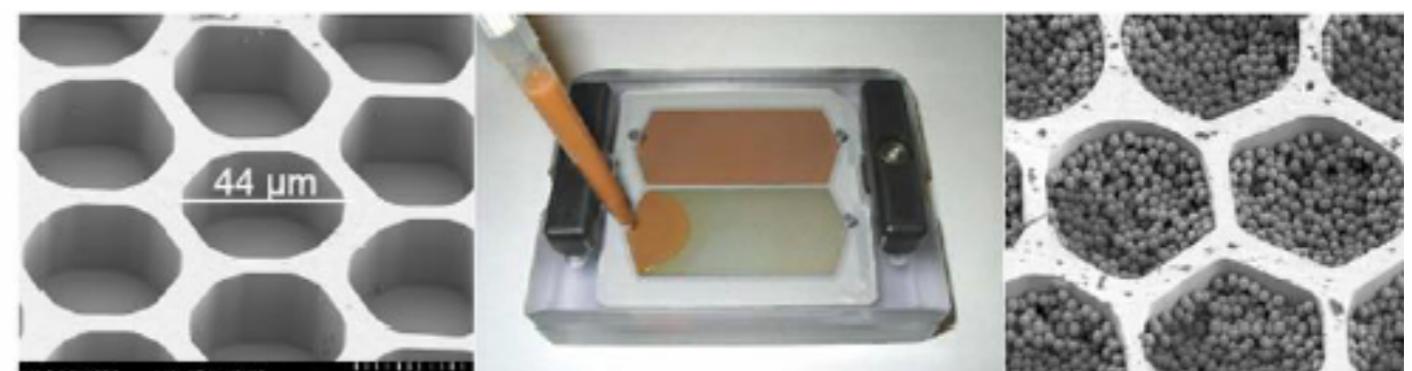
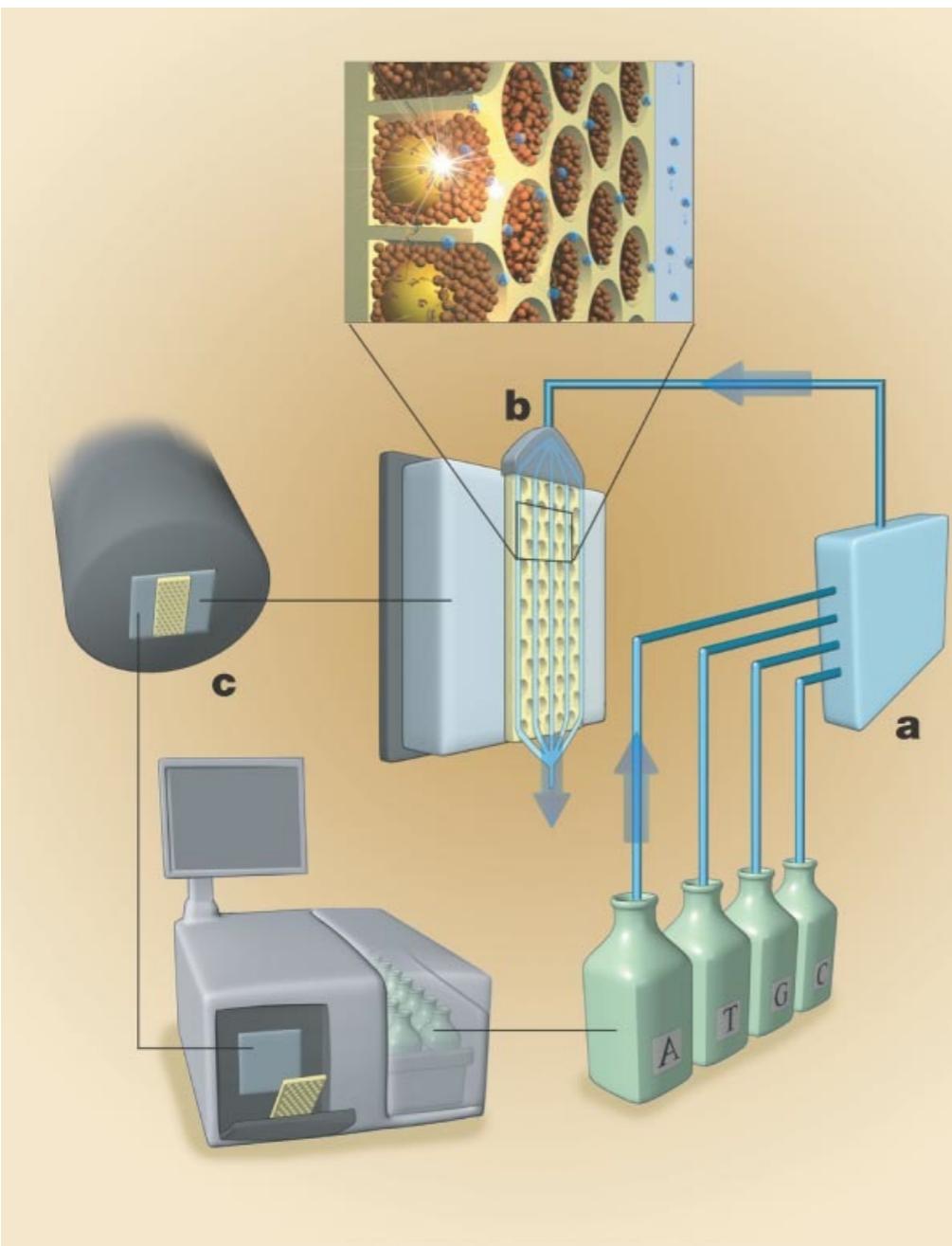


# Пиросеквенирование

"Roche" 454: прочтение с огоньком

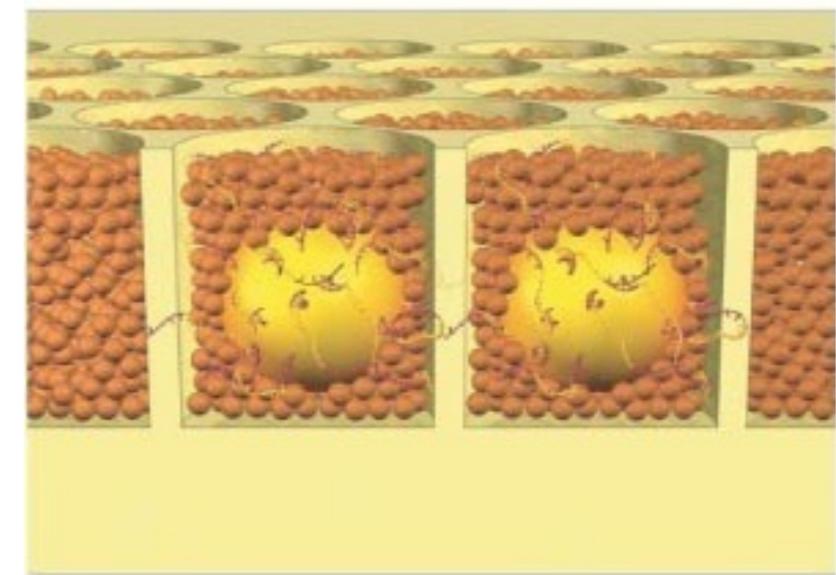
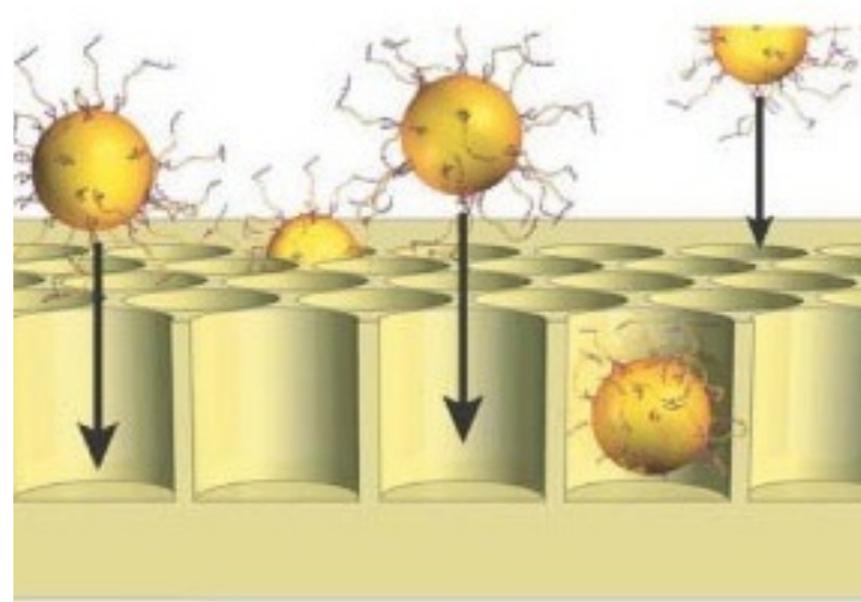
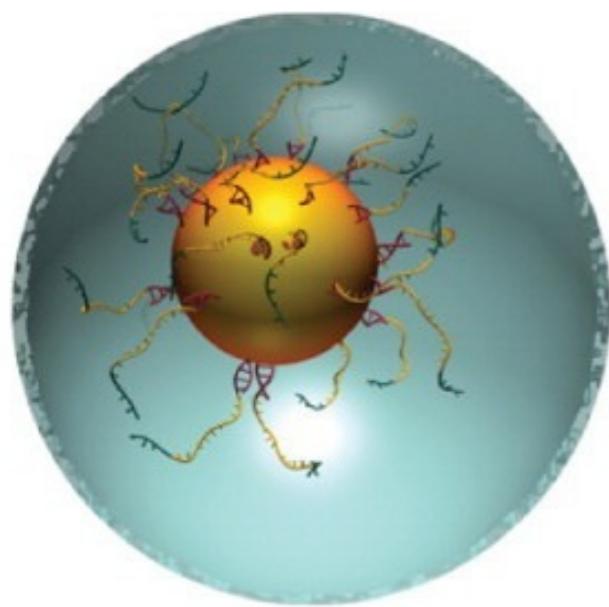
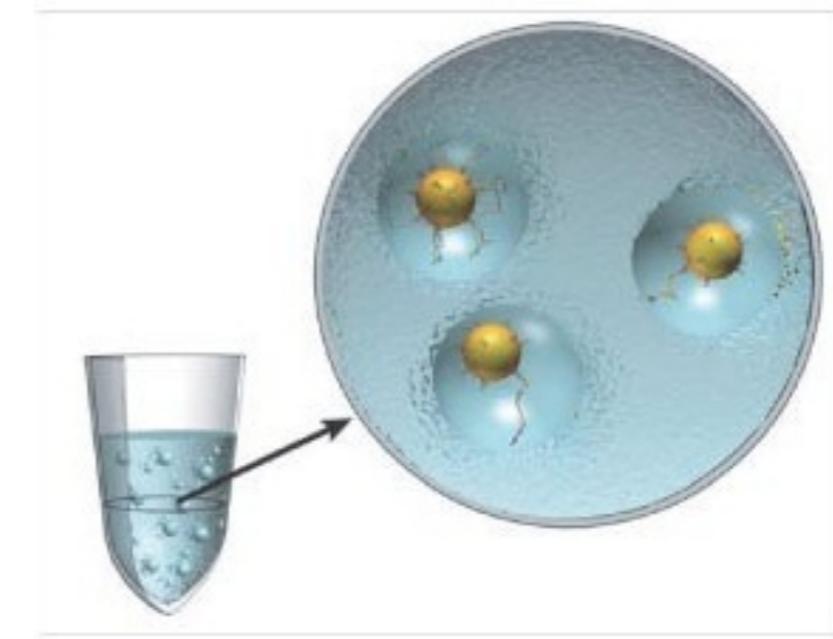
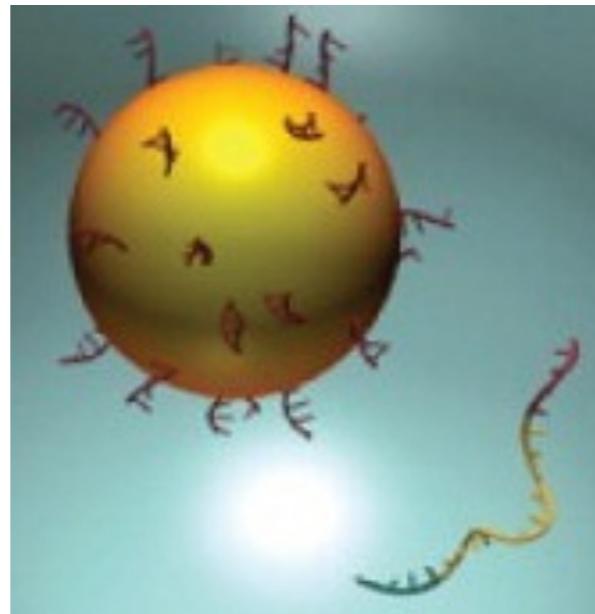
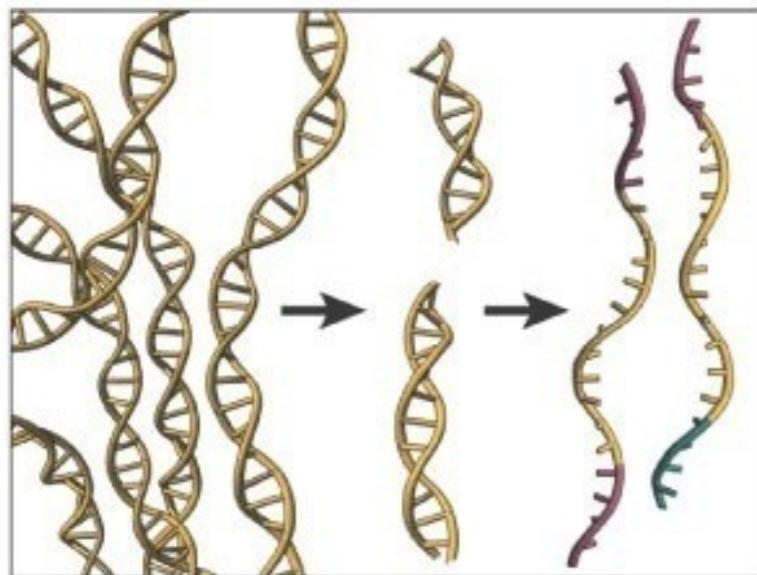


# Пиросеквенирование



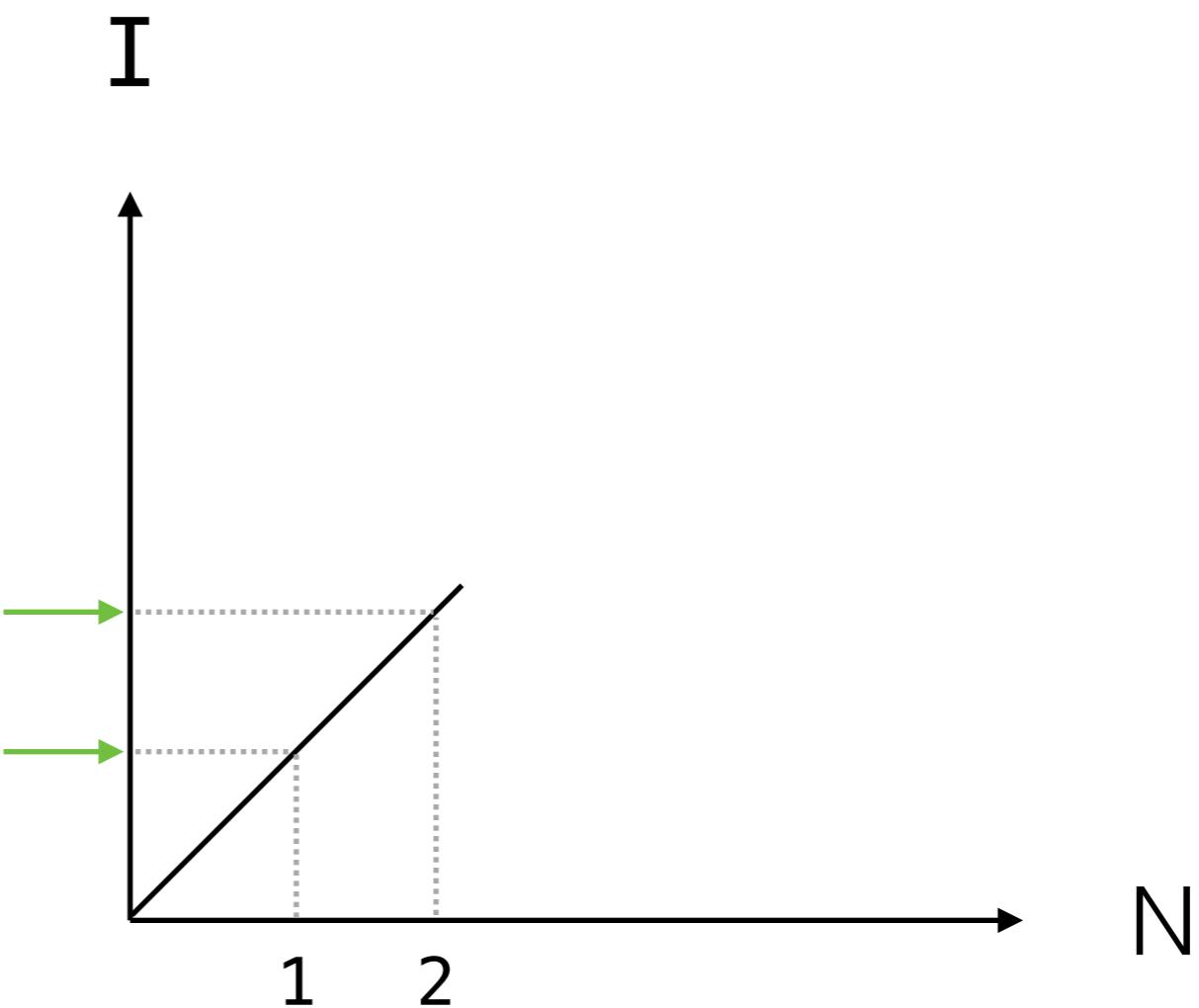
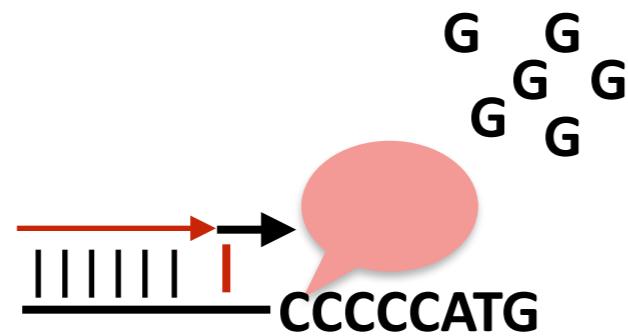
# Пиросеквенирование

*Молекулярные колонии на нанопланетах*



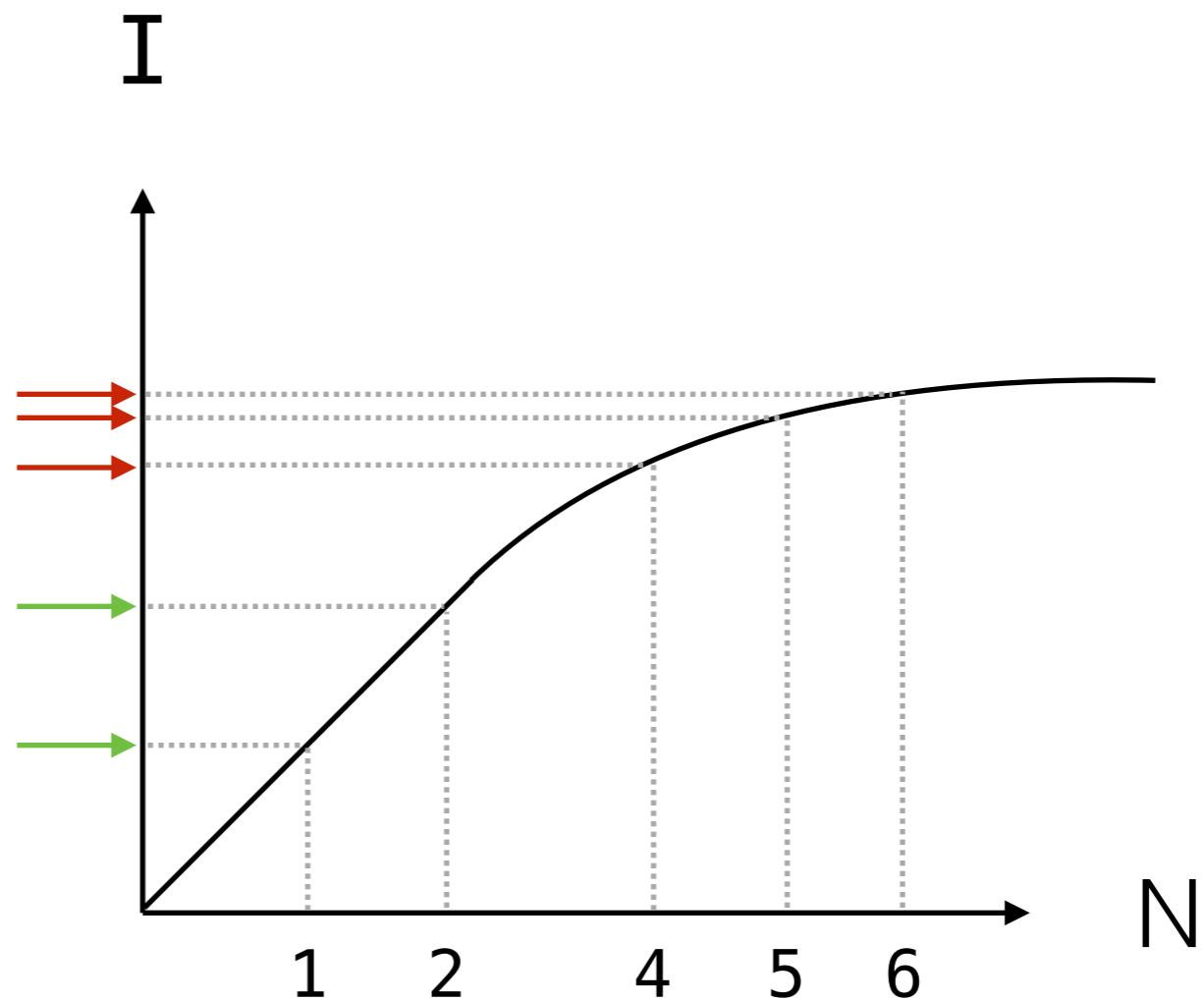
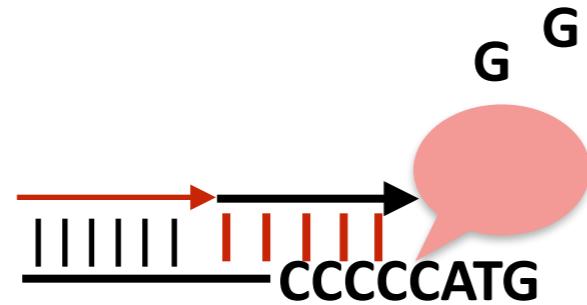
# Ошибки секвенирования

погрешность измерения



# Ошибки секвенирования

погрешность измерения



# Illumina



"Sequencing-by-Synthesis"

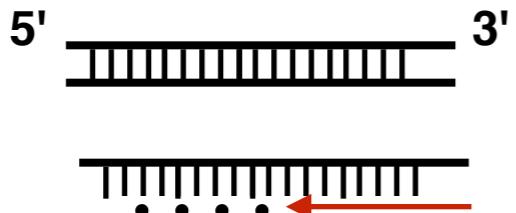
Sample  
Prep

Cluster  
Generation

Sequencing

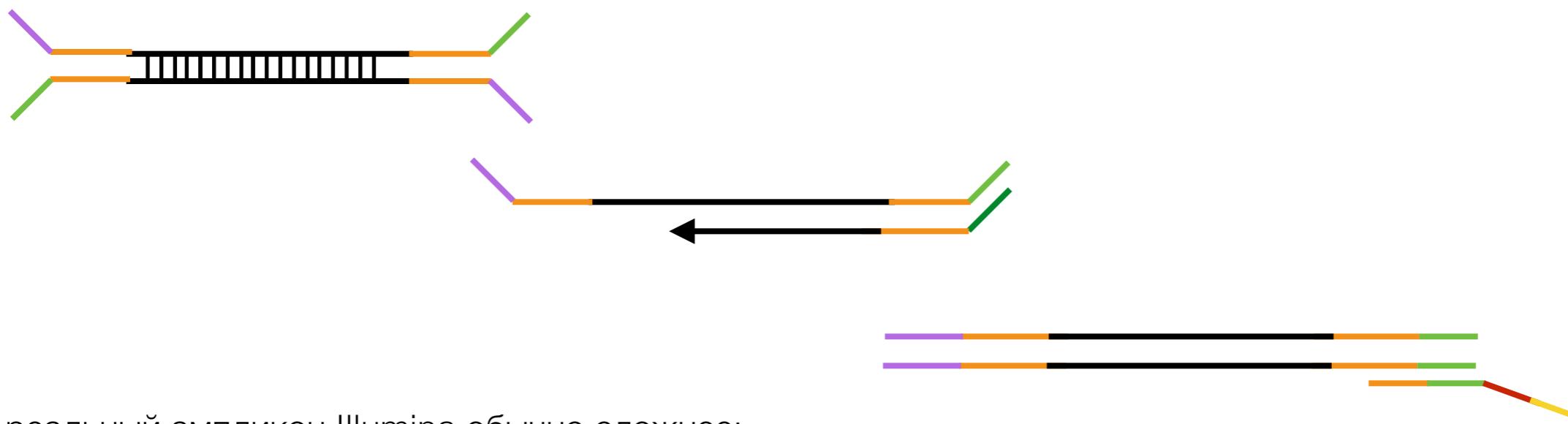
# Структура ампликона

*Рождение молекулярного шедевра*

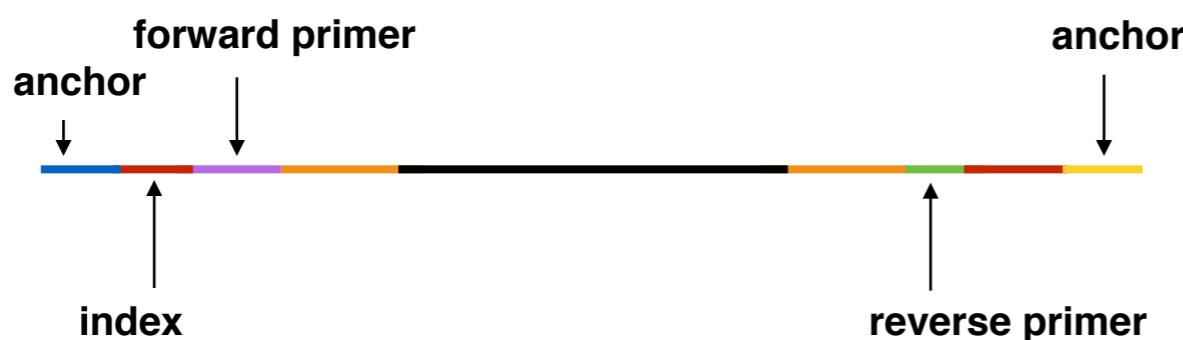


Как добиться того, чтобы молекула ДНК неизвестной последовательности "читалась" лишь с одной определенной стороны?

Лигировать так называемый Y-адаптор амплифицировать с праймера

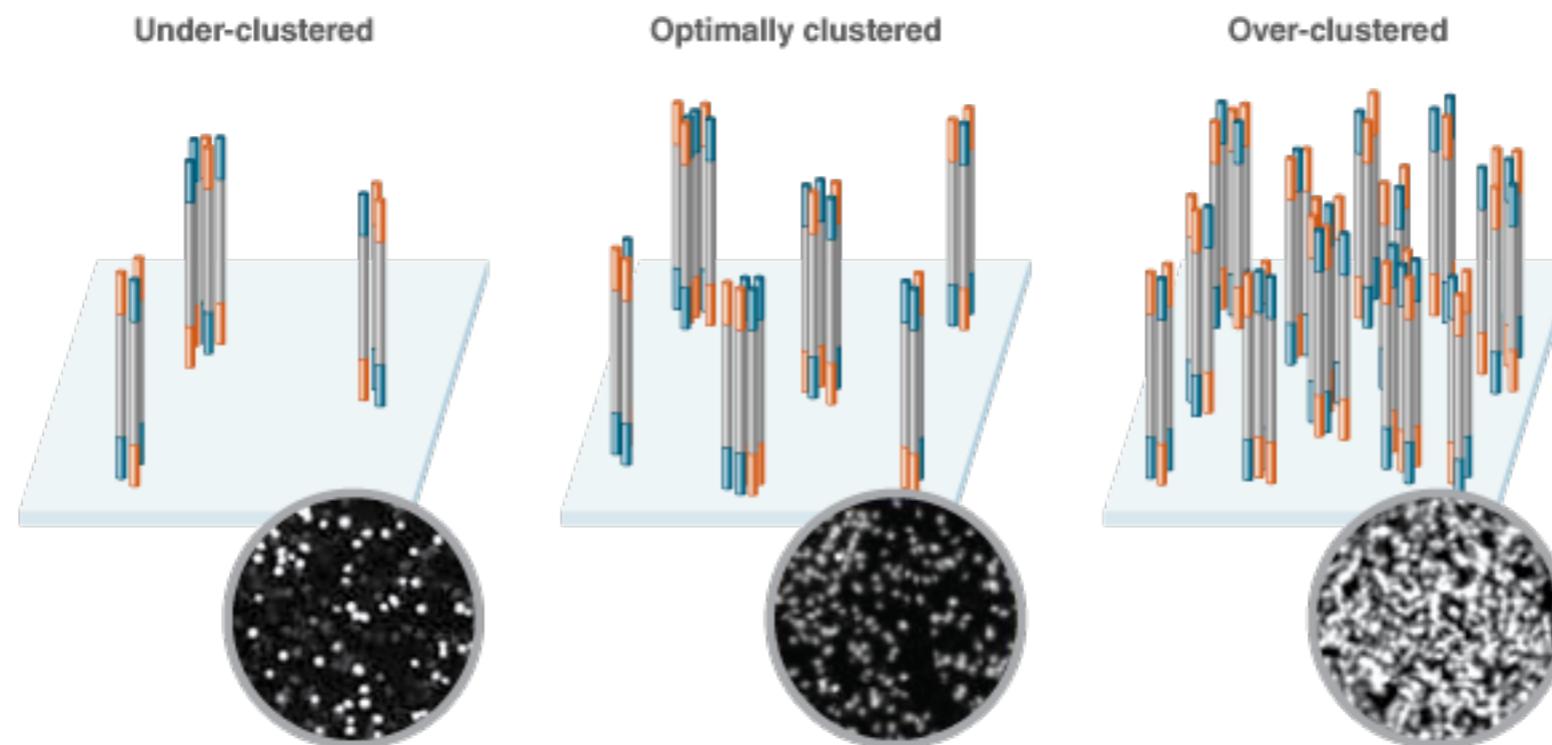
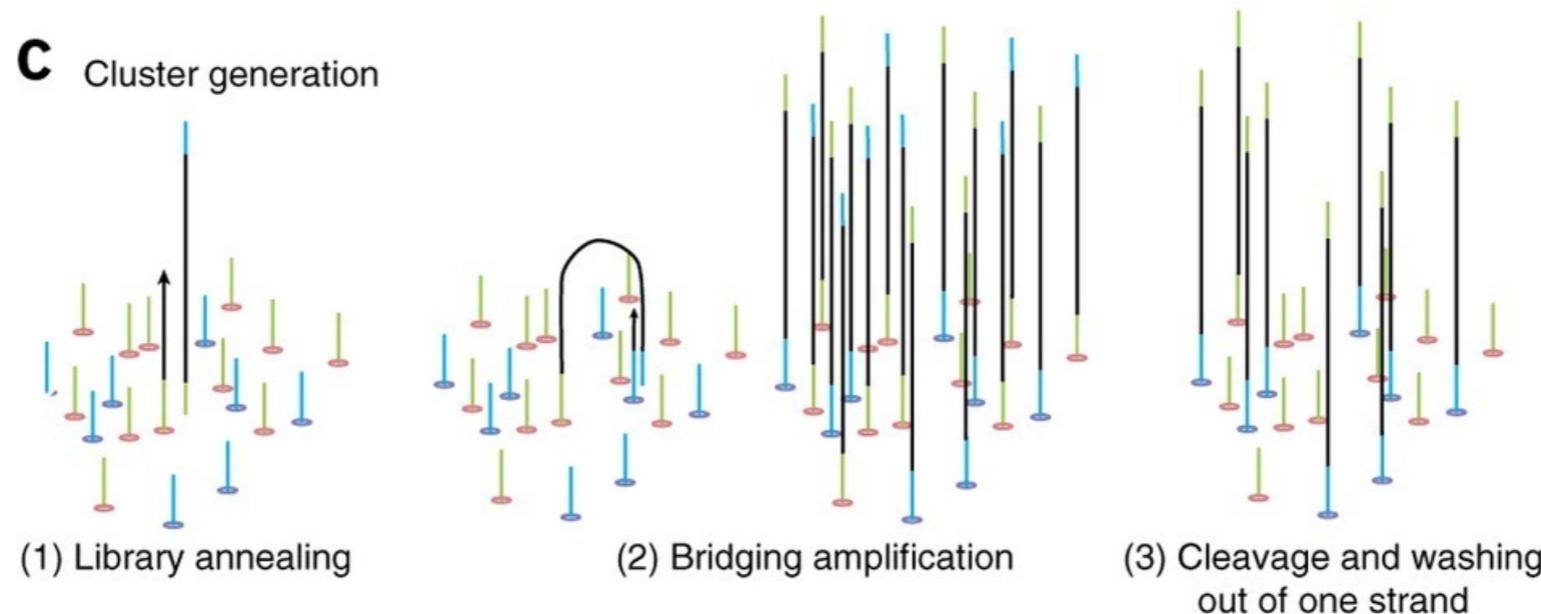


реальный ампликон Illumina обычно сложнее:



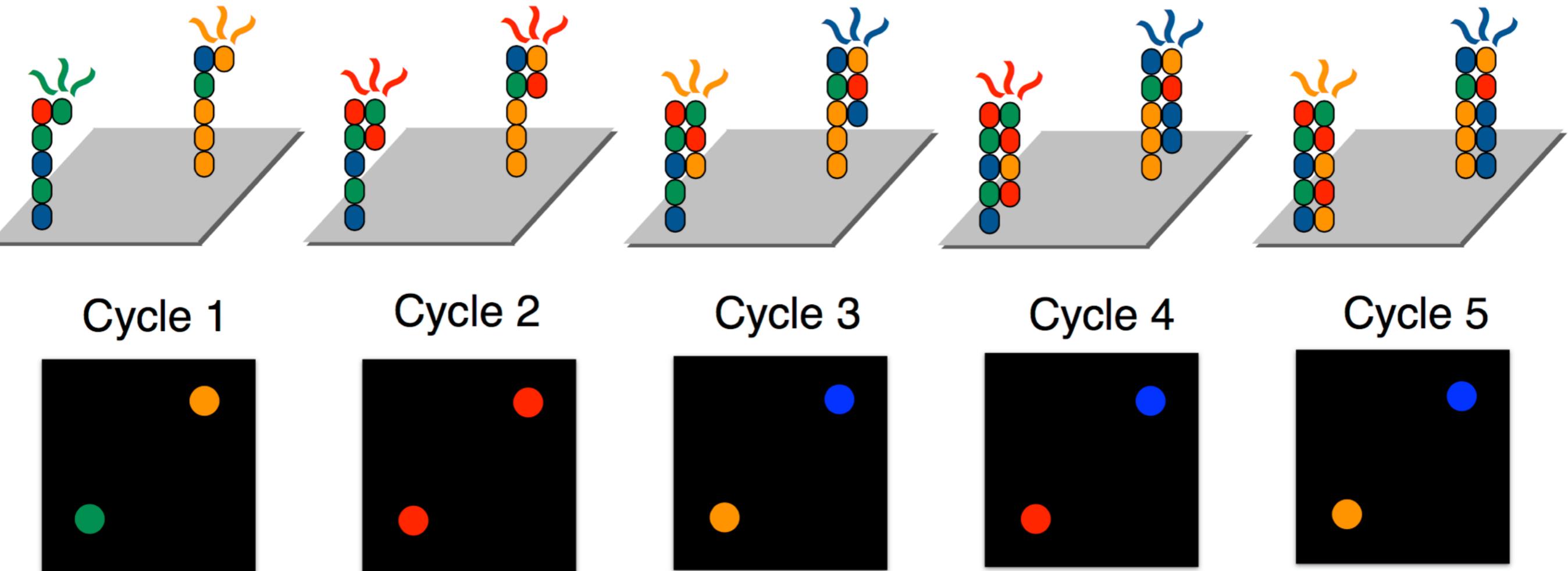
# Генерация кластеров

*Молекулярные основы ландшафтного дизайна*



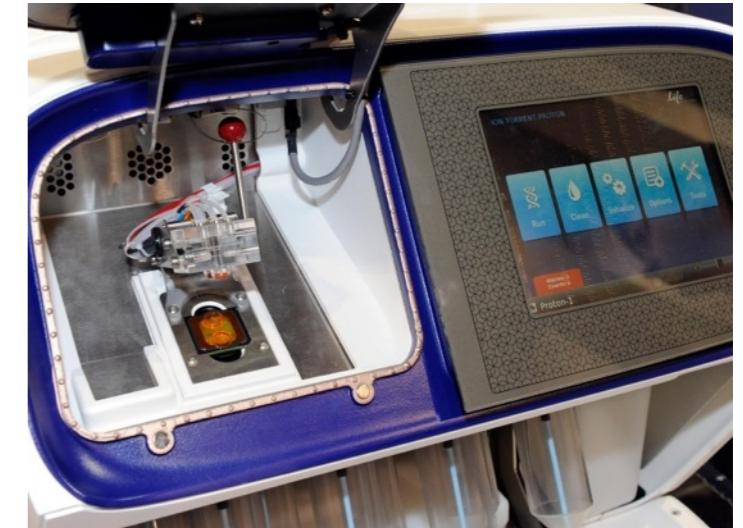
# Секвенирование через синтез

*Ёлочка, гори!*



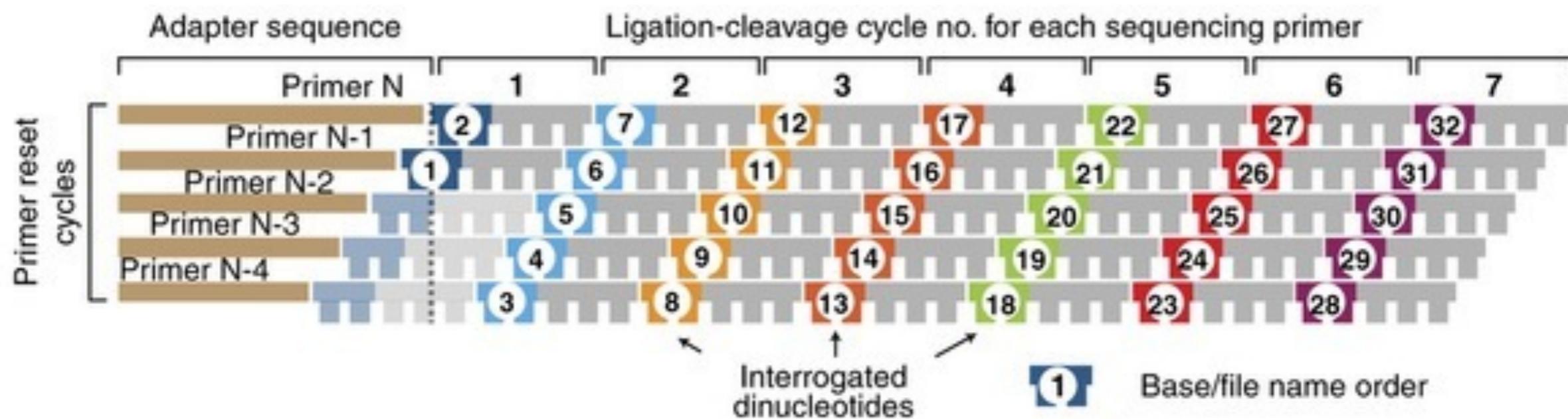
# Полупроводниковое секвенирование

*pH метр высокого разрешения*

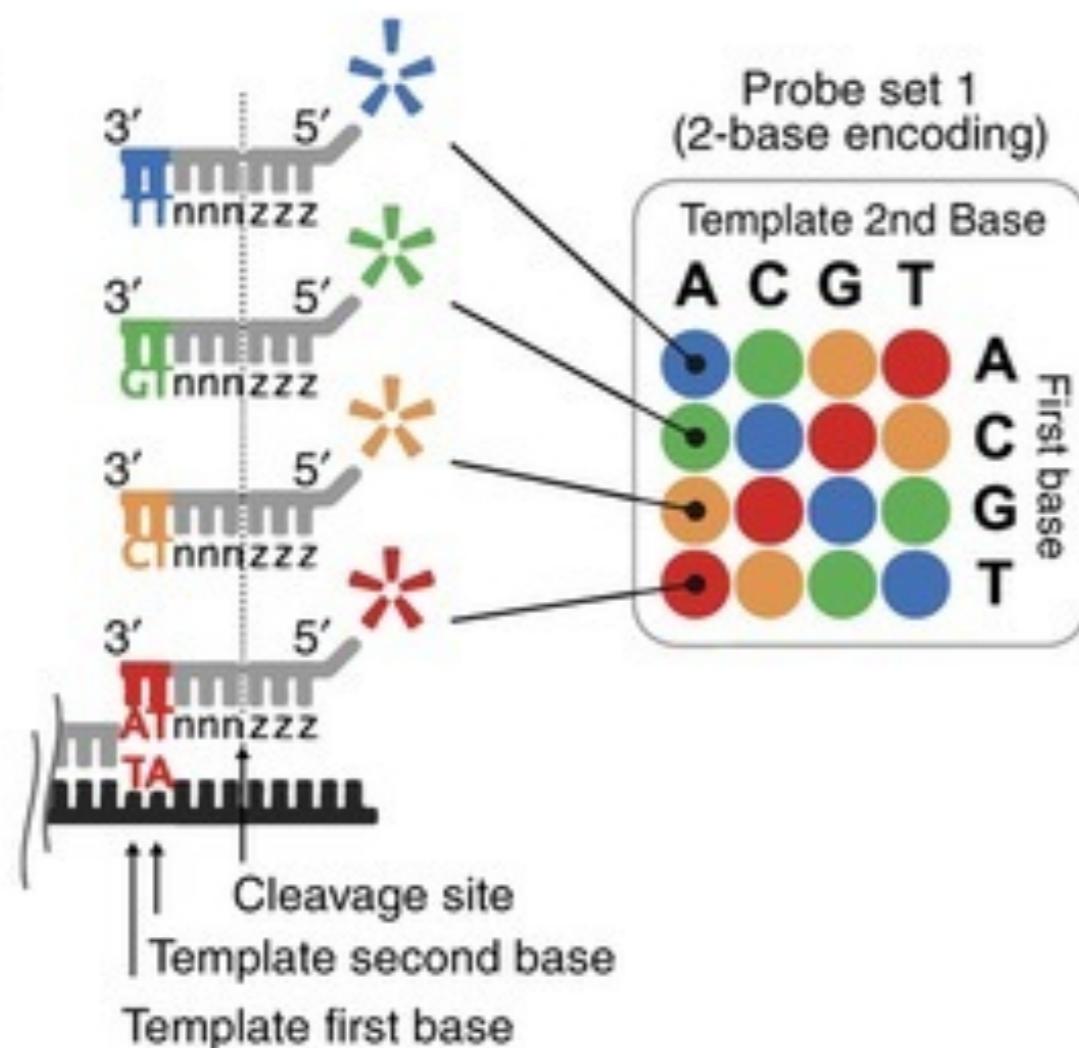


# Секвенирование через лигирование

a

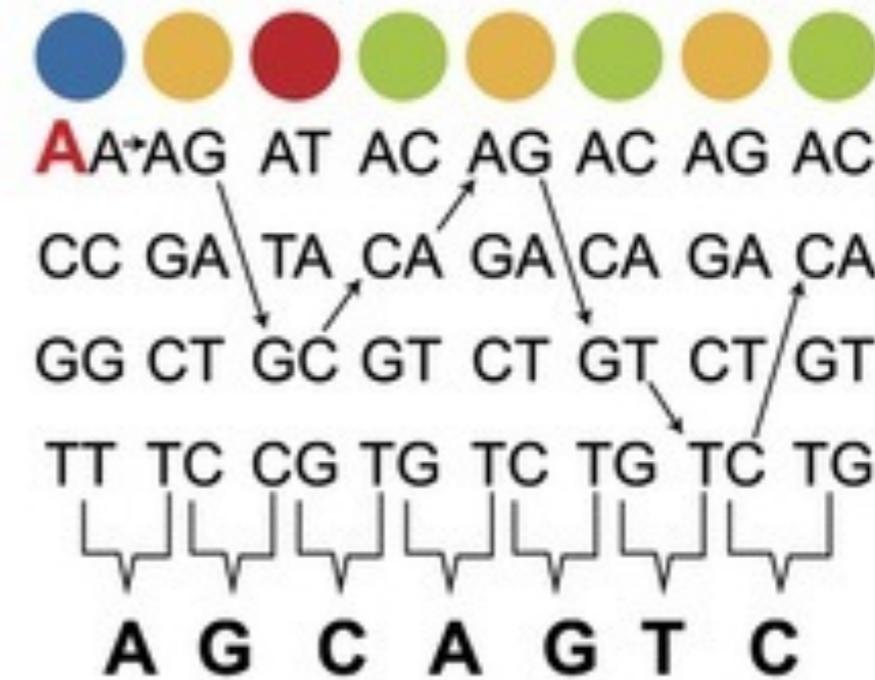


b



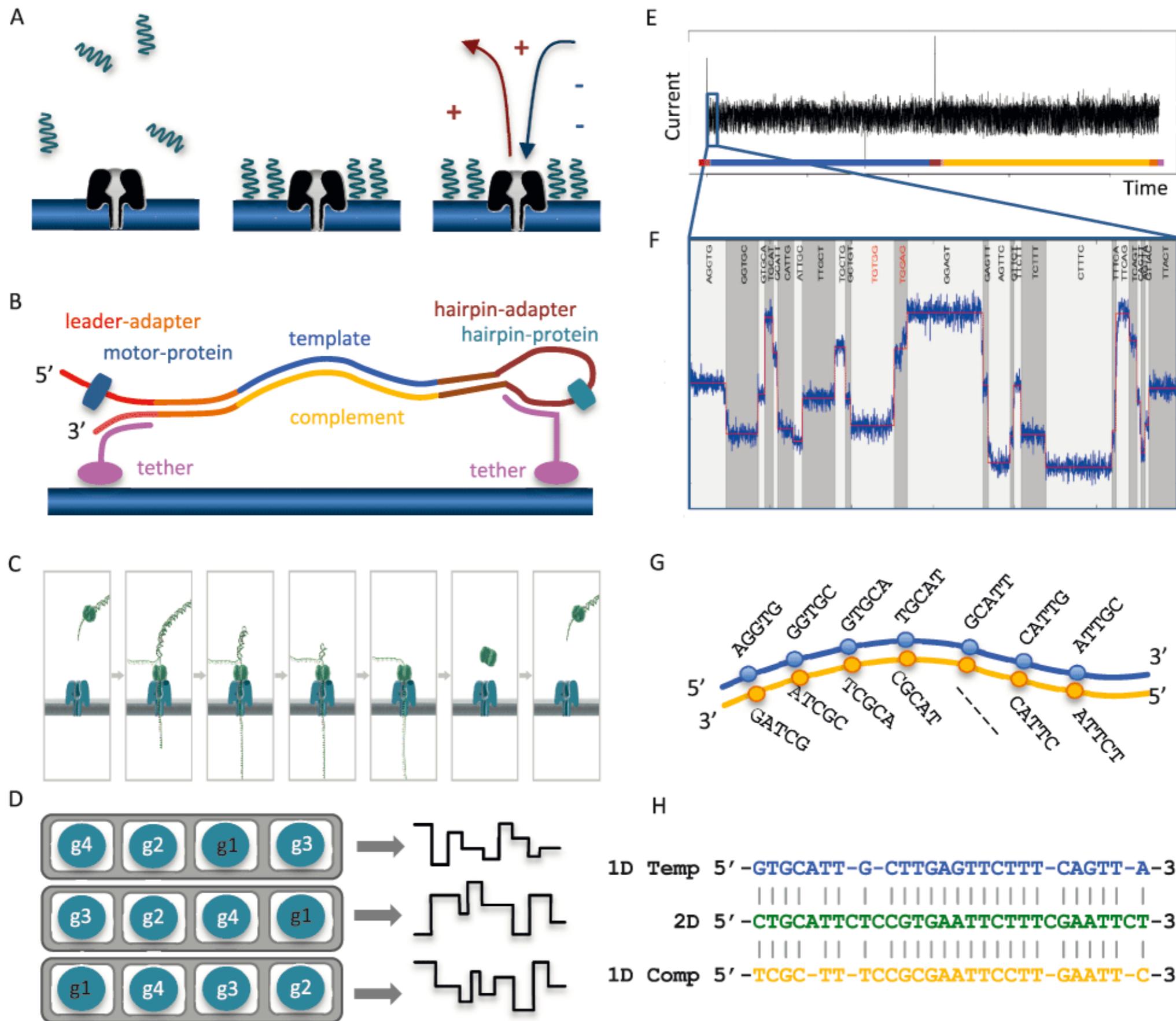
c

Input color sequence with a known base in red



Output sequence

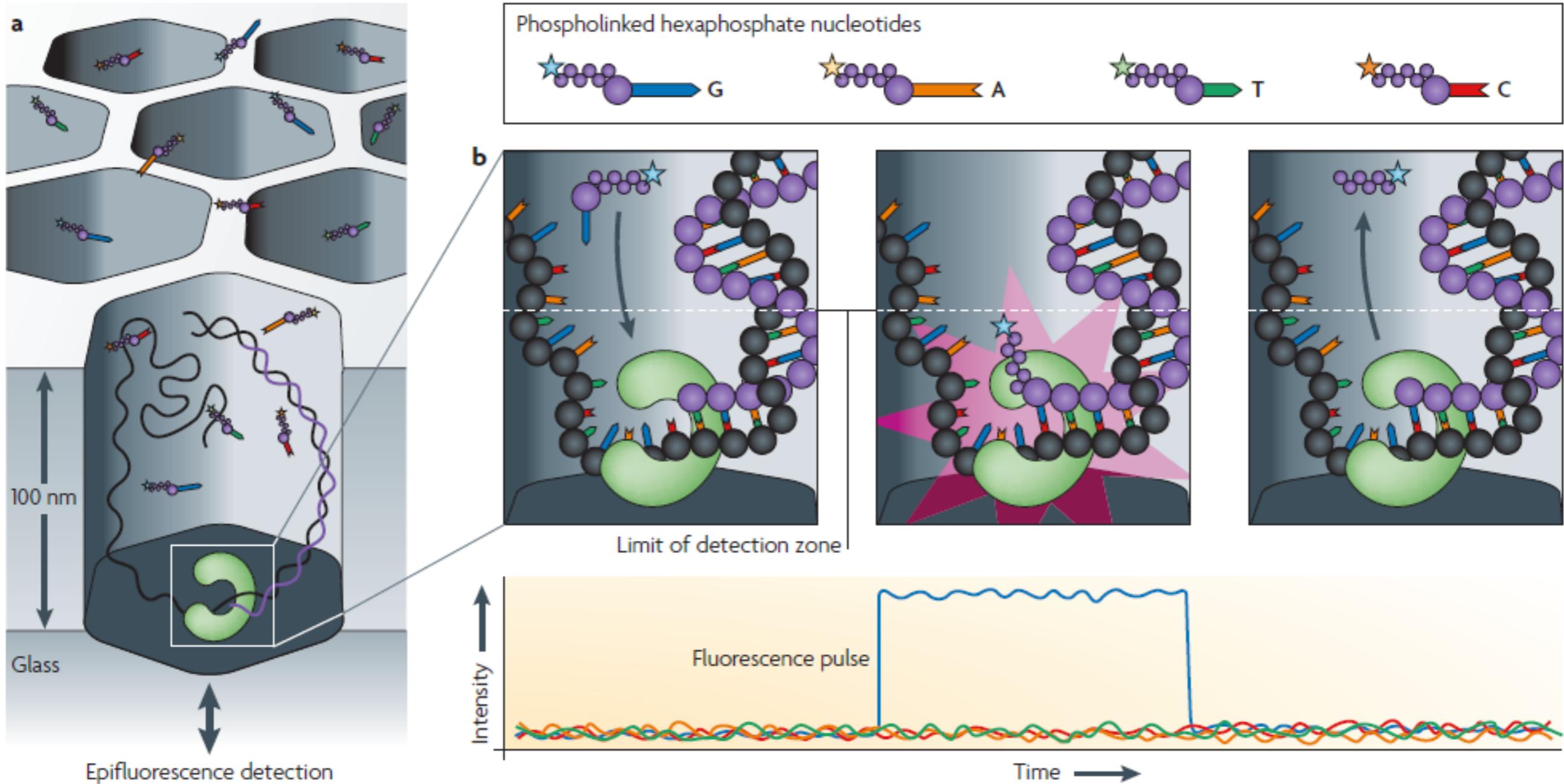
# Oxford Nanopore



# Pacific Biosystems

Читать молекулы в реальном времени

Pacific Biosciences — Real-time sequencing



# Сравнение платформ

Тип	454		Ion		Solexa (Illumina)			SOLID	PacBio	
	Junior	FLX	Torrent	Proton	HiSeq	MiSeq	NextSeq	5500	RSII	Sequel
Длина чтения, bp	400	800	400	200	2x150	2x300	2x150	2x60	10-15kb	10-15kb
Объем данных, Gb	0,035	0,7	2	16	180	15	129	150	1	10
Цена за 1Mbp, \$	22	7	0,6	0,02	0,05	0,14	0,03	0,07	0,4	0,09
Цена инструмента, тысяч \$	125	500	50	149	740	125	250	600	700	350
Цена за запуск, \$	1100	6200	939	1000	6145	1600	4000	10503	400	850
Время работы	10	24	7	4	40	65	29	8 days	0,5-6	0,5-6
Частота ошибок, %	1	1	0,5-2,5	0,5-2,5	0,1	0,1	0,1	--	14	14
Тип ошибок	индели	индели	индели	индели	замены	замены	замены	замены	индели	индели

Спасибо за внимание