

## NGS

La tecnica di sequenziamento di Sanger è in grado di fornire sequenze di circa 800 basi per esperimento.

La maggior parte dei geni sono più lunghi, ma abbiamo visto che con l'utilizzo di primer interni si possono leggere più sequenze sovrapposte, per poi assemblare la sequenza più lunga. La tecnica di terminazione della catena è usata per leggere singoli geni o segmenti all'interno di vettori plasmidici.

La tecnica di terminazione della catena è stata usata per ottenere le prime sequenze genomiche complete, come quella del genoma umano.

L'interesse nel sequenziamento del genoma in ottica di medicina personalizzata ha portato allo sviluppo di tecnologie di sequenziamento di nuova generazione.

Le tecnologie NGS permettono di eseguire il sequenziamento di librerie genomiche, che possono anche rappresentare il genoma di un intero organismo.

### 454 Roche

Nel 2000 Jonathan Rothberg ha commercializzato la prima piattaforma NGS disponibile commercialmente, la GS20. Due anni dopo la sua società è stata comprata da Roche, che ha introdotto una seconda versione della piattaforma di sequenziamento.

Il metodo consiste in alcuni passaggi:

1. Preparazione della libreria di DNA
2. PCR in emulsione
3. Reazione di sequenziamento
4. Analisi dei dati

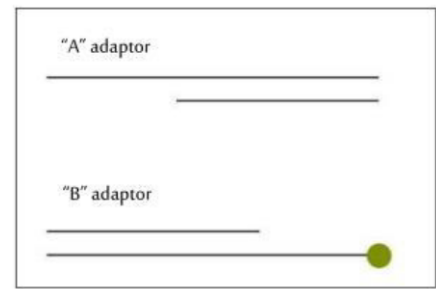
#### *Preparazione libreria di DNA*

È l'insieme dei frammenti di DNA che vengono trattati mediante l'aggiunta di adattatori al 3' e 5' di ogni frammento di DNA. Il DNA può essere DNA genomico, prodotti di PCR, oppure cDNA.

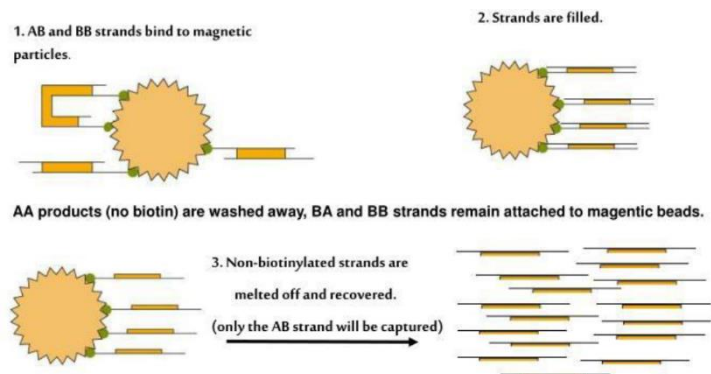
Il primo passaggio consiste nell'estrazione e nella frammentazione del DNA. La frammentazione è un passaggio importante, perché i frammenti devono avere una dimensione adeguata al tipo di sequenziamento che si vuole effettuare. Nel caso specifico i frammenti devono avere una dimensione di 300-500 bp. La rottura del DNA deve essere casuale, in modo da garantire che tutti i segmenti una probabilità simile di essere sequenziati. Di solito si utilizza la sonicazione per la rottura del DNA.

Frammentato il DNA si procede a legare gli adattatori. Gli adattatori sono molecole di DNA a doppio filamento. Gli adattatori sono di due tipi: **A** e **B**.

Gli adattatori sono *blunt* ad una estremità e *sporgenti* all'altra. Questo per assicurare che solo le estremità blunt si leghino ai frammenti di DNA. Gli adattatori sono lunghi 44 basi. Contengono 20 basi complementari ad un primer di PCR, 20 basi complementari al primer di sequenziamento e 4 basi che sono una key. L'adattatore B porta legata una molecola di biotina in 5' dell'estremità sporgente.



Dalla ligazione degli adattatori si ottengono 4 diverse popolazioni di frammenti: AA, AB, BA e BB. Sono di nostro interesse i frammenti che hanno due adattatori diversi, andranno quindi purificati i frammenti AB e BA. Si sfrutta il fatto che l'adattatore B lega la biotina. Si utilizzano sferette che legano sulla loro superficie molecole di streptavidina, che ha una fortissima affinità per la biotina.



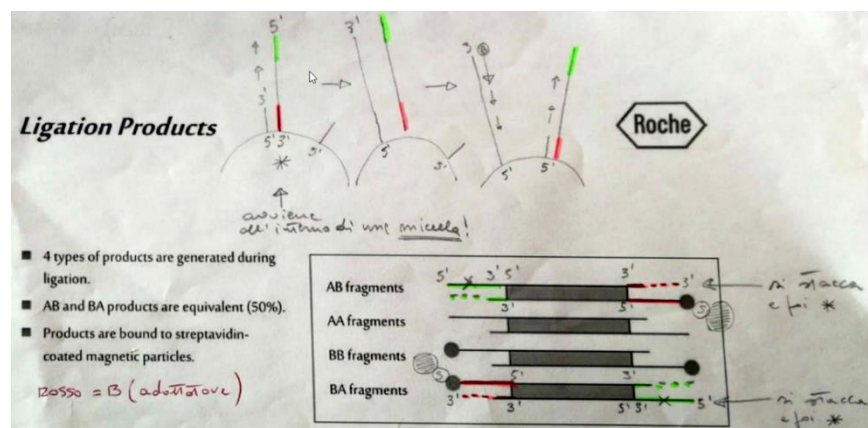
I frammenti AA, che non legano biotina, non si legano alle particelle magnetiche che portano sulla superficie streptavidina. I frammenti AB e BA si legheranno con una sola elica alla sferetta. I frammenti BB si legheranno alle sferette con entrambi i filamenti.

Si effettua quindi un lavaggio che rimuoverà i frammenti non legati, cioè gli AA.

Si effettua un passaggio di denaturazione dove dai frammenti rimasti legati dopo il lavaggio vengono rilasciati i filamenti complementari. Questa sarà la library. A questo punto si fa la PCR in emulsione.

### PCR in emulsione

La PCR in emulsione permette di amplificare, in una singola provetta ma in maniera fisicamente separata, tutti i frammenti di DNA della library. Si utilizzano a questo scopo delle sferette sulla cui superficie sono presenti sequenze oligonucleotidiche complementari all'adattatore B dei ssDNA della library. I



I frammenti della library vengono mescolati con un eccesso di queste sferette, in modo tale che ad ogni sferetta si leghi una sola molecola di DNA della library. Va evitata l'evenienza in cui su una sfera vi sia legato più di un segmento della library. Dato che si utilizza un eccesso di sferette, si avrà la situazione in cui la sferetta non avrà legato alcuna molecola di DNA della library.

La PCR avviene sulla sferetta. La miscela di PCR contiene le sferette che legano un frammento della library, oltre ad enzimi, primer (di cui il **primer A lega biotina al 5'**) e dNTP. Il primer A lega biotina e fa partire la sintesi del filamento complementare; questo permette di avere un amplificato che poi si lega con la biotina alla streptavidina sulla sferetta.

Si fa una emulsione della miscela di PCR ed olio minerale. Si creano così delle micelle, ognuna delle quali contiene una sferetta, che lega un frammento di DNA della library, ed i reagenti necessari alla PCR. Ogni micella si comporta da bioreattore per PCR.

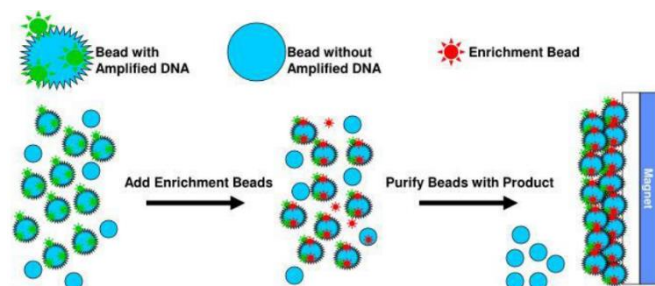
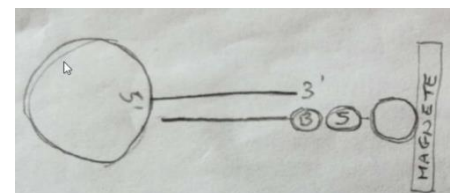
Alla fine sulla superficie della sferetta ci saranno milioni di copie dei singoli cloni della libreria per ogni sferetta. Ci saranno anche sferette vuote, per cui va fatto un arricchimento della soluzione per rimuovere le sferette che non hanno legato alcun filamento di DNA della library.

### Arricchimento

L'arricchimento si fa con altre sferette, che legano sulla superficie molecole di streptavidina. Si incubano le sfere che portano l'amplificato assieme alle sferette di arricchimento che portano la streptavidina. La streptavidina su queste ultime sferette legherà alla biotina che è legata al 5' del primer A utilizzato per la PCR in emulsione.

Si usa quindi un magnete, a cui si legheranno le sferette di arricchimento. Questo permette di selezionare le sferette che effettivamente legano l'amplificato.

In seguito a denaturazione, il filamento che lega biotina resta legato alla biglia di arricchimento. Si separano così le due sferette e i due filamenti di DNA ed è possibile così sequenziare le sferette che portano l'amplificato.



- Beads with amplified DNA have the **biotinylated "A" primer**
- Beads with DNA product are extracted using streptavidin coated, magnetic Enrichment Beads
- Approximately 10% of beads have bound product

### Sequenziamento

Il sequenziamento di questa library avviene in una particolare piastra che prende il nome di *picotiter*. Questa ha una struttura a nido d'ape, con tantissimi pozzetti (oltre il milione) di dimensioni adeguate a contenere una sferetta magnetica ciascuno.

Si aggiungono quindi particelle che legano sulla superficie gli enzimi necessari alla reazione di sequenziamento. In ogni pozzetto è presente anche una DNA polimerasi.

I dNTP non vengono aggiunti tutti assieme, ma uno alla volta.

Il picotiter viene posizionato davanti ad un rilevatore CCD.

L'amplificazione della library mediante PCR in emulsione è molto importante, perché da questa dipende la qualità delle *reads*. Il segnale del sequenziamento è visibile solo se il frammento da sequenziare è presente in più copie, per questo si genera l'amplificato sulle sferette, e le sferette vengono isolate in pozzetti.

## Pirosequenziamento

In ogni pozzetto troviamo una pallina che ha sulla superficie tante copie di un singolo filamento di DNA. Si utilizza la reazione di pirosequenziamento. Questa è una metodica diversa rispetto a quella di Sanger. In questo caso la sequenza è letta grazie alla chemiluminescenza che si ha al legame di un nucleotide alla catena. Ciascun lampo di chemiluminescenza riflette l'incorporazione di un dNTP complementare alla sequenza del DNA stampo.

I nucleotidi vengono aggiunti uno alla volta. Se il nucleotide è complementare si legherà alla sequenza in allungamento, emettendo una chemiluminescenza. Se il nucleotide non è complementare verrà degradato enzimaticamente, e sarà aggiunto il nucleotide seguente.

Il limite di questo sistema è che è necessaria una pausa ad ogni ciclo della reazione di allungamento.

Ogni volta che viene incorporato un dNTP nella catena nascente viene liberato del pirofosfato PPi. L'enzima *solforilasi* è in grado di convertire, in presenza di Adenosin 5-fosfo Solfato APS, il PPi in ATP. Questo enzima si trova sulle particelle che legano enzimi localizzate all'interno del pozzetto.

L'ATP permette alla *luciferasi* di catalizzare la conversione di *luciferina* in *ossiluciferina*, con emissione di luce. La luce prodotta viene rilevata dalla CCD camera, e viene visualizzata come un picogramma, dove l'intensità dell'emissione luminosa del picco registrato dipende dal numero di basi incorporate nella sequenza. L'intensità della chemiluminescenza aumenta con l'aumentare del numero di basi consecutive incorporate, fino ad un massimo di 5-6 basi oltre le cui ci potrebbero essere errori nella misura. Il nucleotide specifico rilasciato in un dato ciclo è conosciuto allo strumento, per cui la presenza della chemiluminescenza dopo l'aggiunta di un determinato nucleotide viene interpretata come legame dello specifico nucleotide nella sequenza.

