

## SOLiD

SOLiD è l'acronimo della tecnologia *Sequencing Oligo Ligation Detection*, ed ora anche il nome del sequenziatore che la utilizza.

La principale differenza con le metodiche precedenti Roche454 ed Illumina è che il sequenziamento non avviene per sintesi, ma per l'appaiamento di specifiche sonde.

Questa tecnologia permette di ottenere reads fino a 75bp.

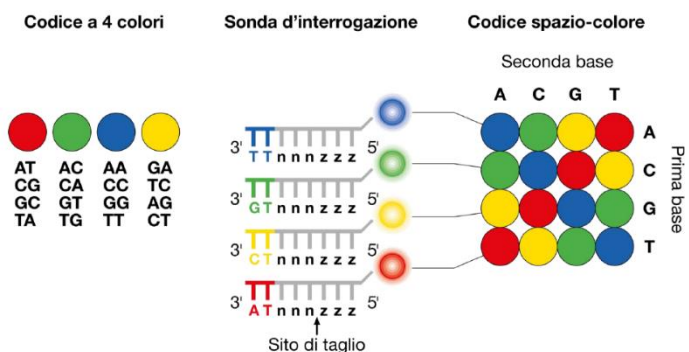
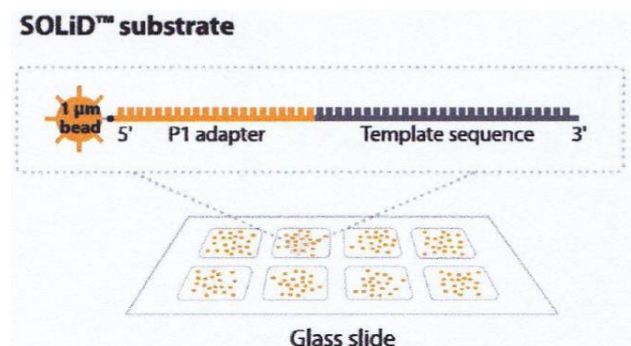
### Preparazione della libreria

Si utilizzano specifici adattatori da legare alla libreria di frammenti di DNA. Questo sistema richiede una amplificazione clonale, che può avvenire sia in emulsione che su vetrino.

Il frammento da sequenziare è legato all'adattatore dall'estremità 5'.

Le sonde utilizzate sono chiamate *sonde di interrogazione*. Si tratta di una libreria di frammenti di DNA da 8 nucleotidi, di cui i primi 5 dall'estremità 3' si accoppiano al template in modo specifico, mentre gli ultimi 3 in modo aspecifico. Tra i primi 5 nucleotidi e gli ultimi 3 è presente un sito di taglio.

Queste sonde sono marcate con un fluoroforo diverso a seconda dell'identità dei primi due nucleotidi, per un totale di 16 combinazioni.



### Sequenziamento

Il sequenziamento avviene in vari passaggi:

#### 1. Priming e ligazione:

Si utilizza un primer universale complementare alla sequenza dell'adattatore precedentemente legato all'estremità 5' del frammento di DNA da sequenziare. Dopo l'appaiamento del primer si legherà una delle sonde in modo contiguo al primer, quella che ha una omologia nelle prime 5

posizioni della sequenza. Si effettua un lavaggio per rimuovere le molecole non legate. Si inserisce una ligasi che lega il primer alla prima sonda.

## 2. Immagine

Si eccita il fluoroforo legato in posizione 5' ad ogni sonda, per cui si avrà l'emissione di fluorescenza che verrà registrata dal rilevatore.

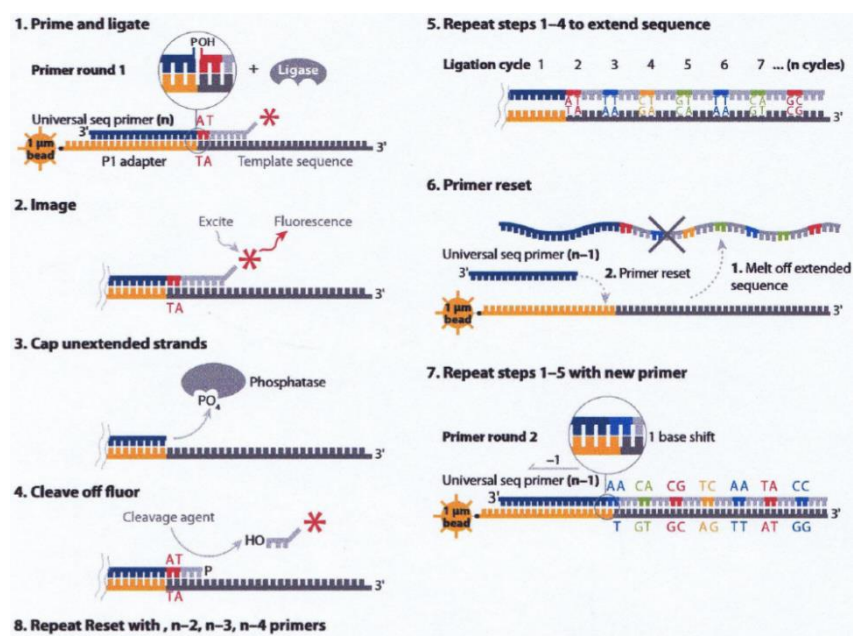
## 3. Cap unextended strands

## 4. Clivaggio del fluoroforo

Si effettua un taglio sul sito di taglio della sonda, che rimuove anche il fluoroforo insieme ai 3 nucleotidi terminali.

Questi passaggi vengono ripetuti più volte in modo da estendere il primer che si era originariamente appaiato. Dopo l'ultimo ciclo il filamento ottenuto viene rimosso per denaturazione.

A questo punto si riparte con un nuovo primer, il primer (n-1), che termina una base prima rispetto al primer precedente. Usando questo primer il sequenziamento inizia da una posizione prima rispetto al precedente, che corrisponde all'ultimo nucleotide dell'adattatore, che è conosciuto. Si avrà quindi la lettura in un nuovo frame.



Viene ripetuta questa procedura, con primer progressivamente sfalsati di un nucleotide ad ogni ciclo successivo, in modo che ogni nucleotide sia letto due volte.

In questo modo la sequenza può essere dedotta dalle reads.

Il vantaggio della metodica SOLiD è la grande accuratezza nel sequenziamento della metodica. Il principale svantaggio è la capacità di fare reads relativamente corte.

Ciclo 1	Posizione	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	
	1 Primer universale (n) 3'																																					
	2 Primer universale (n-1) 3'																																					
	3 Primer universale (n-2) 3'																																					
	4 Primer universale (n-3) 3'																																					
	5 Primer universale (n-4) 3'																																					
		Sonda ponte																																				
		Sonda ponte																																				
		Sonda ponte																																				
		Sonda ponte																																				
		Sonda ponte																																				
		Sonda ponte																																				
		Sonda ponte																																				
		Sonda ponte																																				
		Sonda ponte																																				
		Sonda ponte																																				
		Sonda ponte																																				
		Sonda ponte																																				
		Sonda ponte																																				
		Sonda ponte																																				
		Sonda ponte																																				
		Sonda ponte																																				
		Sonda ponte																																				
		Sonda ponte																																				
		Sonda ponte																																				
		Sonda ponte																																				
		Sonda ponte																																				
		Sonda ponte																																				
		Sonda ponte																																				
		Sonda ponte																																				
		Sonda ponte																																				
		Sonda ponte																																				
		Sonda ponte																																				
		Sonda ponte																																				
		Sonda ponte																																				
		Sonda ponte																																				
		Sonda ponte																																				
		Sonda ponte																																				
		Sonda ponte																																				
		Sonda ponte																																				
		Sonda ponte																																				
		Sonda ponte																																				
		Sonda ponte																																				
		Sonda ponte																																				
		Sonda ponte																																				
		Sonda ponte																																				
		Sonda ponte																																				
		Sonda ponte																																				
		Sonda ponte																																				
		Sonda ponte																																				
		Sonda ponte																																				
		Sonda ponte																																				
		Sonda ponte																																				
		Sonda ponte																																				
		Sonda ponte																																				
		Sonda ponte																																				
		Sonda ponte																																				
		Sonda ponte																																				
		Sonda ponte																				</																

