

NGS di terza generazione

I sistemi di sequenziamento più usati attualmente sono i sistemi NGS di seconda generazione, principalmente Illumina e Ion Torrent.

I sistemi NGS di terza generazione stanno facendo progressi, e potrebbero soppiantare i sistemi di sequenziamento precedenti.

I punti deboli dei sistemi di seconda generazione sono diversi. Tra i principali punti deboli troviamo l'*amplificazione clonale*, che non solo è dispendiosa ma può portare all'accumulo di errori.

Un altro punto debole è rappresentato dalle ridotte dimensioni delle reads prodotte. Reads corte rendono difficile l'assemblaggio, specialmente quando si devono assemblare genomi *de novo*.

I vantaggi delle metodiche NGS di terza generazione sono diversi:

Permettono di effettuare sequenziamento su singola molecola di DNA, il che significa che non è più necessaria l'amplificazione della libreria, con risparmio di tempo e reagenti, e con una riduzione di errori.

Questi metodi permettono di ottenere reads più lunghe rispetto alle metodiche di seconda generazione, nell'ordine delle decine di migliaia di basi.

Le piattaforme di terza generazione riducono i tempi di sequenziamento, soprattutto per applicazioni in real-time.

PacBio

PacBio è la piattaforma di sequenziamento prodotta da Pacific Biosciences, nota anche col nome SMRT, Single Molecule Real-time Technology.

Questo metodo non richiede una pausa ad ogni reazione di allungamento. La lunghezza delle reads va dalle 10k fino a 60k basi. Il tasso di errore è relativamente alto, di circa il 15%.

Se il frammento viene sequenziato più volte, usando anche opportuni algoritmi di allineamento, è possibile ridurre in modo drastico il tasso di errore, arrivando ad una accuratezza molto vicina al 100%.

Un punto importante è che poiché il sistema è in grado di rilevare la velocità relativa di incorporazione dei nucleotidi, è anche possibile determinare le modificazioni presenti sui nucleotidi. Modificazioni presenti sui nucleotidi ne alterano la velocità di incorporazione per cui è possibile rilevare queste modificazioni.

Workflow

La procedura di preparazione della libreria richiede vari passaggi.

Ipotizzando di dover sequenziare un intero genoma. Il genoma va frammentato e le estremità vanno riparate. Alle estremità di ciascun frammento si aggiungono degli adattatori.

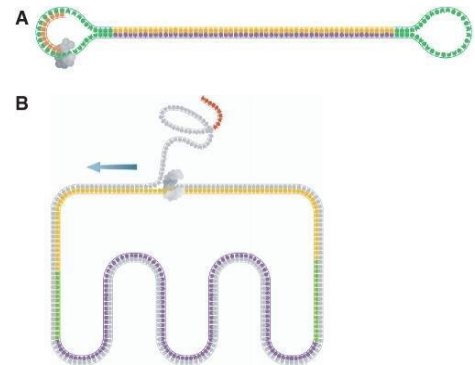
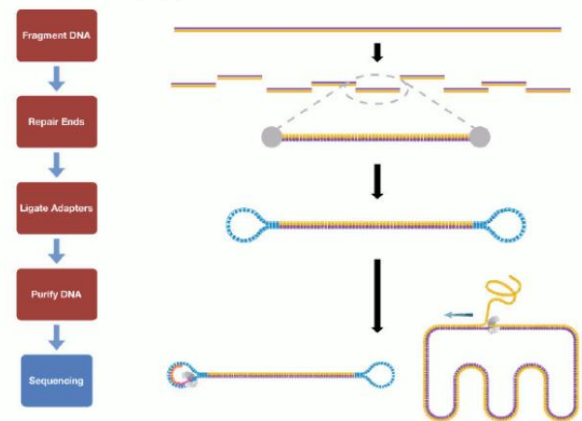
Questi adattatori hanno una forma a forcina, e legano in un loop i due filamenti della doppia elica, dando un frammento di DNA circolare. Il frammento di DNA legato agli adattatori a forcina prende il nome di **SMRTbell template**.

Affinché possa avvenire il sequenziamento è necessario un primer, il quale si lega su uno dei due adattatori a forcina.

Si usa una DNA polimerasi con attività di strand displacement. La polimerasi estende il primer, duplicando tutto il frammento circolare fino a ritornare all'origine del primer. Qui la polimerasi esercita la sua attività di strand displacement, staccando il filamento già duplicato e continuando la replicazione in loop, sequenziando molte volte l'intera sequenza.

Il sequenziamento avviene sia sul filamento *senso* che sul filamento *antisense*, che si trovano appunto legati dagli adattatori in un DNA circolare.

SMRT™ sequencing sample preparation workflow



La reazione di sequenziamento avviene all'interno di microcelle molto particolari, del diametro di circa 50nm, chiamate ZMW, *Zero Mode Waveguide*.

Ciascuna molecola di SMRTbell verrà inserita in un ZMW. Sul fondo di questi pozzetti è immobilizzata una molecola di DNA polimerasi.

Si usano nucleotidi

fluorescenti, ciascuno dei quali legati ad un fluoroforo diverso. Ciascun fluoroforo è attaccato al fosfato terminale del nucleotide.

Il chip di sequenziamento è chiamato SMRT cell, e consiste in oltre 150.000 ZMW, in grado di generare reads da 10.000 a 60.000 bp.

