



# GIẢI TRÌNH TỰ SANGER

**ĐINH THÀNH PHƯỚC**

Nhân viên ứng dụng

Email: [dinhthanhphuoc@sisc.com.vn](mailto:dinhthanhphuoc@sisc.com.vn)  
[phuoc362@gmail.com](mailto:phuoc362@gmail.com)

Phone: (+84) 988.97.97.08



■ The world leader in serving science

# Agenda

1 Giới thiệu

2 Sanger vs NGS

3 Nguyên lý

4 Ứng dụng



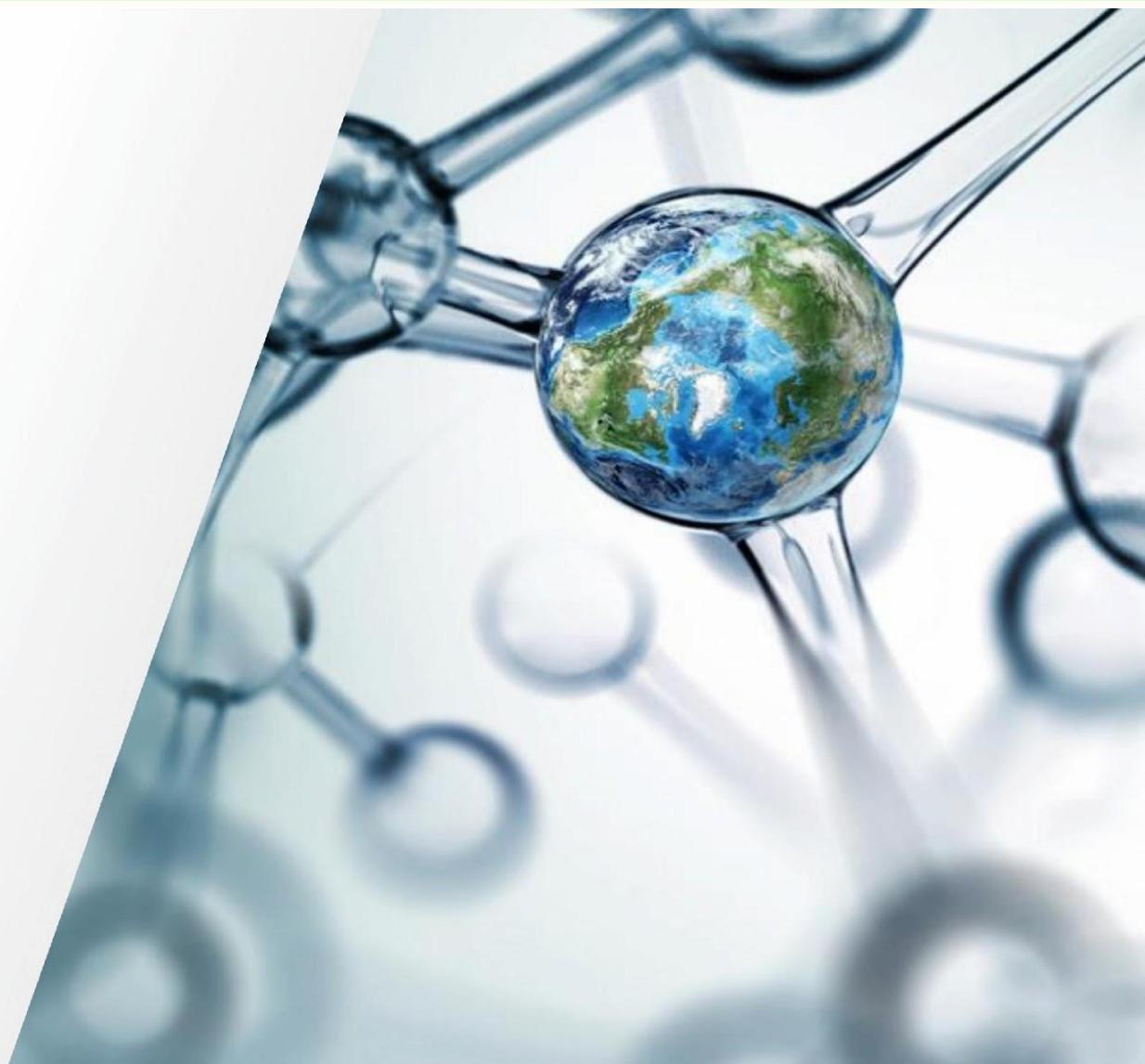


# TỔNG QUAN VÀ GIỚI THIỆU

Giới thiệu công ty

Giới thiệu sản phẩm

Giới thiệu dịch vụ



## Giới thiệu về tập đoàn Thermo Fisher Scientific

- \$44.92 billion in revenues (2022) - \$3.11 billion (CoVid)
- \$1.471 billion spent on R&D
- >50,000 employees
- >50 countries
- 5 premier brands

> 25 năm



**ThermoFisher**  
SCIENTIFIC

thermo  
scientific

applied  
biosystems

invitrogen

Fisher  
Scientific

unity  
lab services

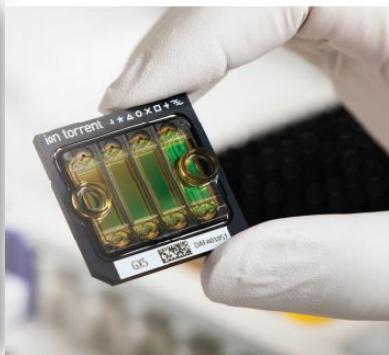
<https://ir.thermofisher.com/investors/news-events/news/news-details/2023/Thermo-Fisher-Scientific-Reports-Fourth-Quarter-and-Full-Year-2022-Results/#:~:text=quarter%20of%202021.-,Full%20Year%202022,versus%20%2439.21%20billion%20in%202021.>

D11/D6 Trần Thái Tông, Khu đô thị mới Cầu Giấy, Cầu Giấy, Hà Nội | Tel: 84-4 3747 2258 | Fax: 84-4 3747 2260

Số 27 - 29 - 31 Đường 9A, KDC Trung Sơn, Đô thị Nam Sài Gòn, Bình Chánh, TP. Hồ Chí Minh | Tel: 84-8 5431 8877 | Fax: 84-8 5431 8570



- Real-Time PCR Assays
- Real-Time PCR Reagents & Kits
- Sequencing Technology Solutions
- Microarray Analysis
- Applied Biosystems Real-Time PCR Promotions



### Real-Time PCR (qPCR)



We've developed powerful assay design algorithms, optimized master mixes, created intuitive data analysis software, and built smart instrumentation to help harness the power of real-time PCR across a rich and diverse set of applications.

### Digital PCR



Digital PCR uses molecular counting to provide highly precise and sensitive results. It is ideal for applications such as absolute quantification of differential gene expression and rare-allele detection.

### Microarray analysis



We provide innovative products, tools, and resources that help advance the work of researchers via microarray analysis.

### Sanger sequencing



Applied Biosystems genetic analysis systems are a trusted standard for Sanger sequencing and fragment analysis by capillary electrophoresis—proven through decades of results.

### Rapid DNA solutions



Partners in forensics—from investigators and police officers to DNA analysts, medical examiners, and criminal justice attorneys—can benefit from Rapid DNA in many applications.



### Ion Torrent Genexus Integrated Sequencer



### Ion AmpliSeq Technology



### Ion GeneStudio S5 series

## Giới thiệu về tập đoàn SISC

Công ty Cổ phần Thiết bị Sài Gòn  
- Thành lập năm 1992

**SISC GROUP**  
(năm 2005)

Công ty Cổ phần Thiết bị SISC  
Việt Nam  
- Thành lập năm 1997



Applied Rigaku Technologies, Inc.



Authorized  
Distributor

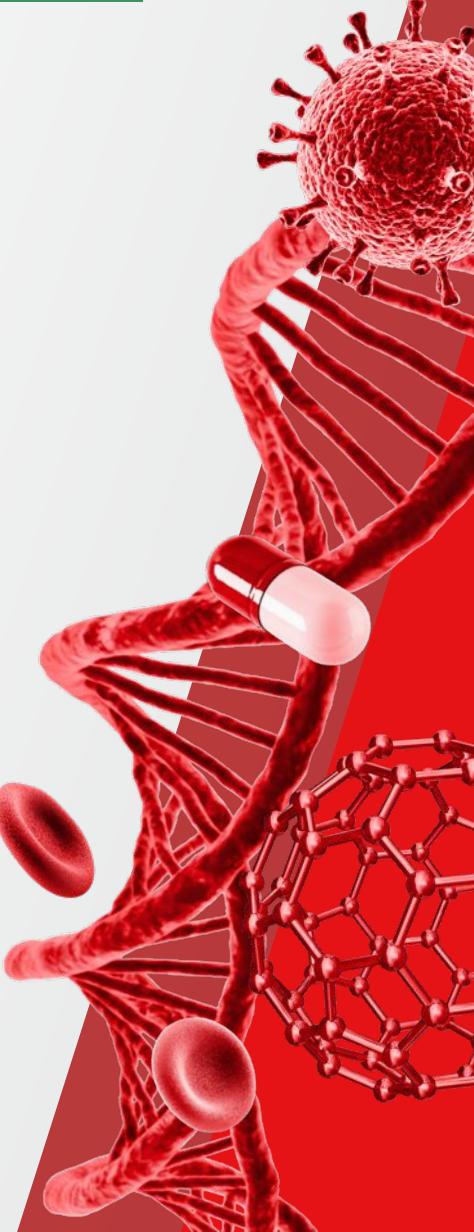
applied  
biosystems iontorrent



# GIẢI TRÌNH TỰ SANGER VỚI NGS

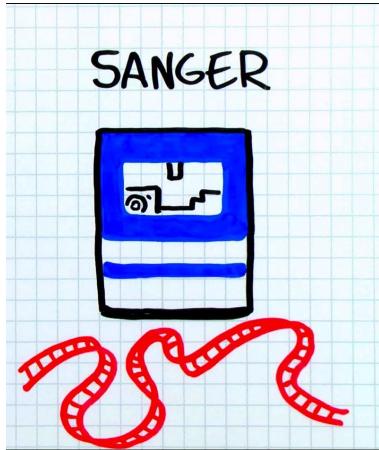


The world leader in serving science

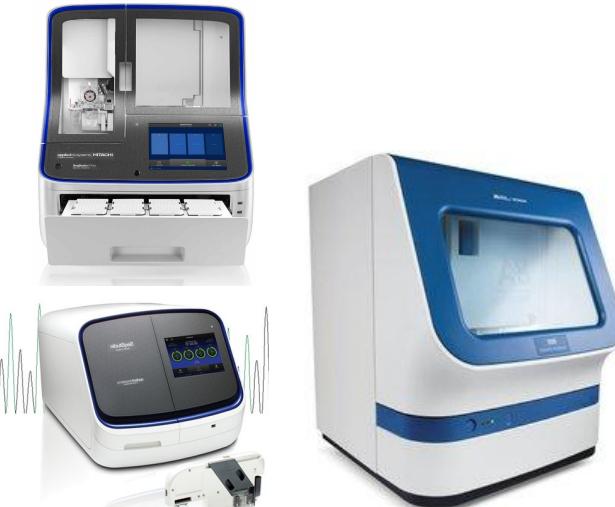


# MỘT SỐ KĨ THUẬT GIẢI TRÌNH TỰ

First generation  
(Sanger sequencing)



<= 800-1200 bp



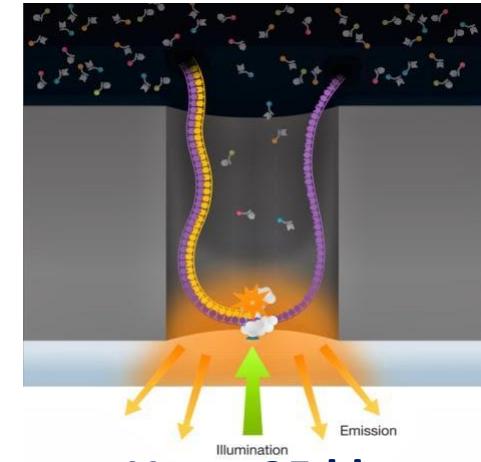
Second generation  
(Next generation sequencing)



>5 Mb  
~ 100-600 bp/ read



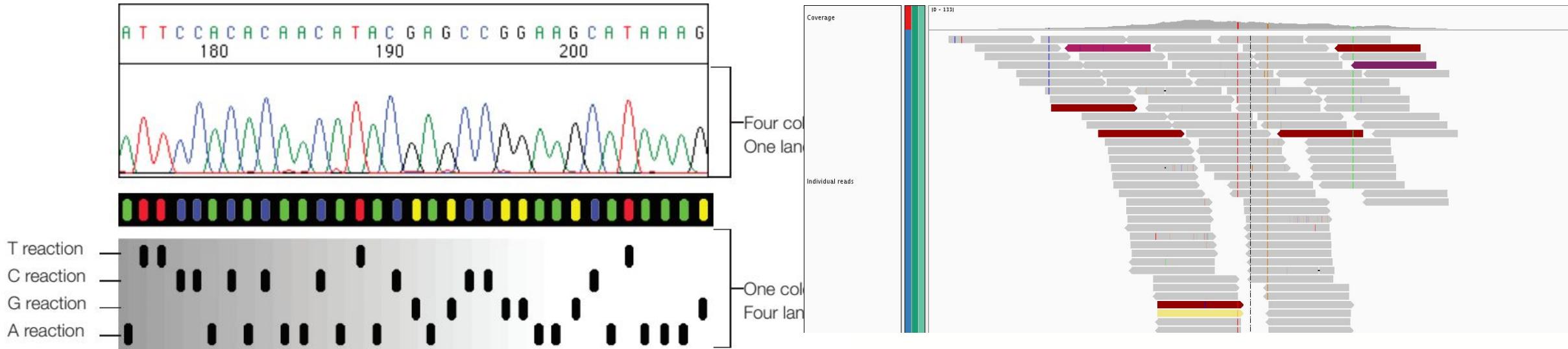
Third generation  
(Single Molecule Real-Time)  
(SMRT)



Up to 25 kb



# SO SÁNH KĨ THUẬT SANGER VS KĨ THUẬT NGS

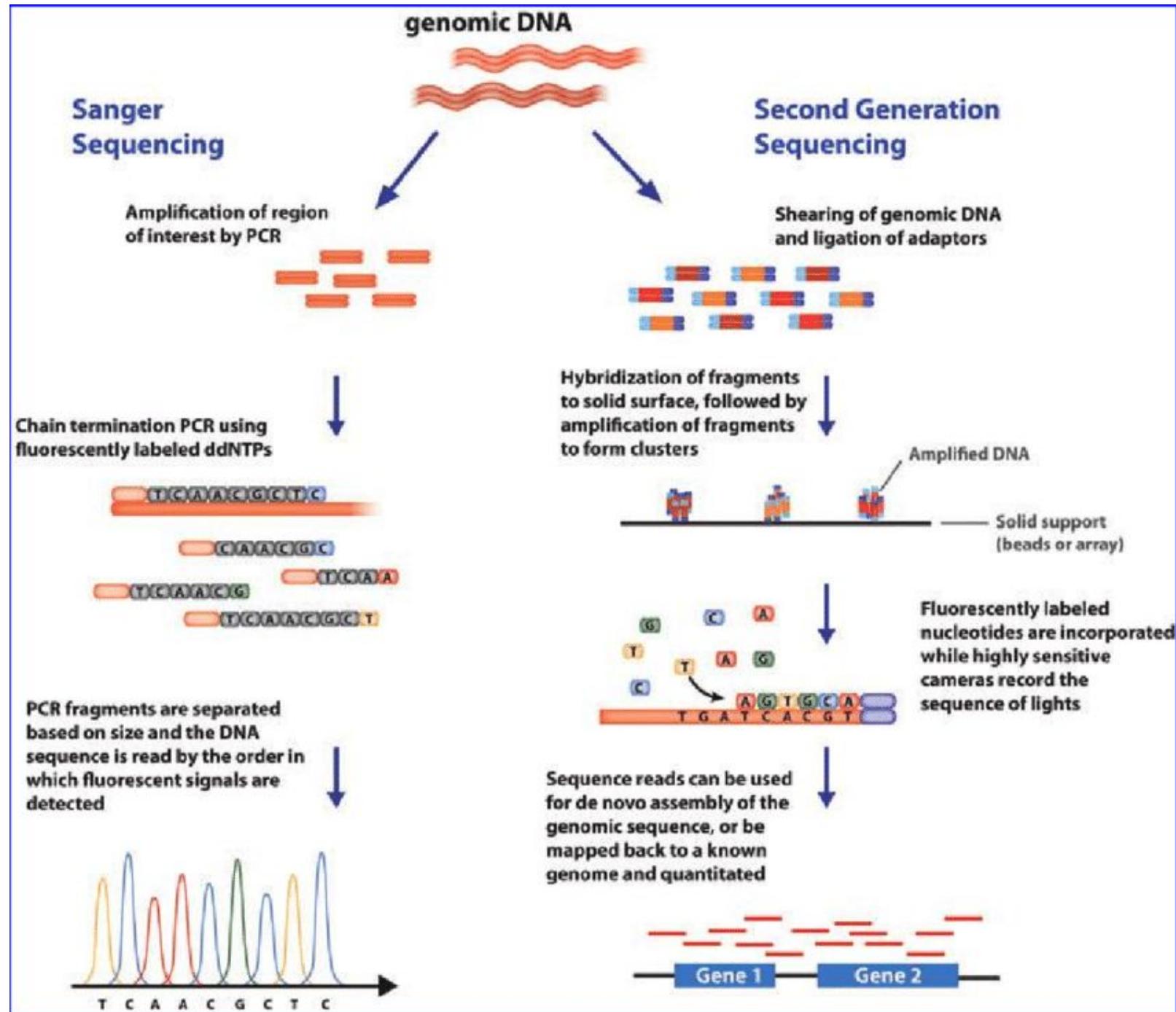
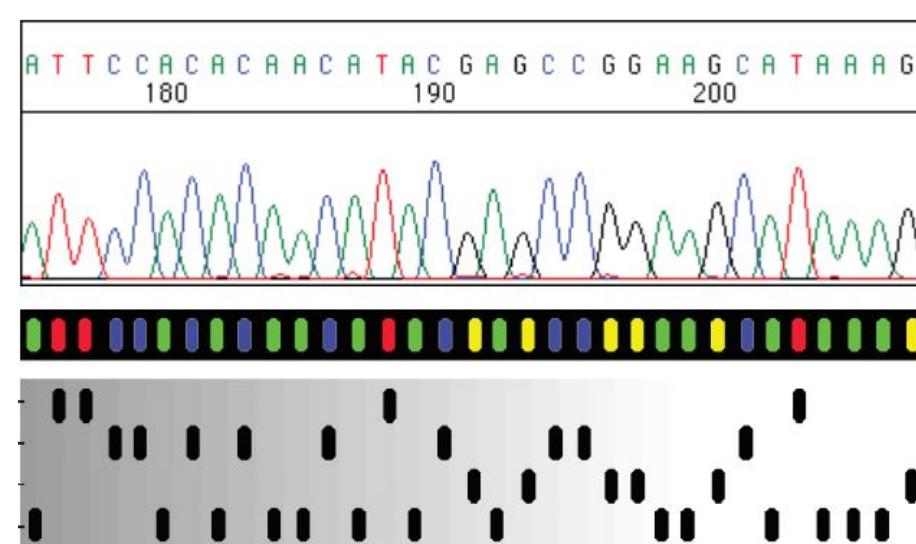
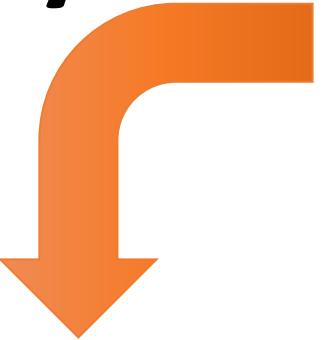


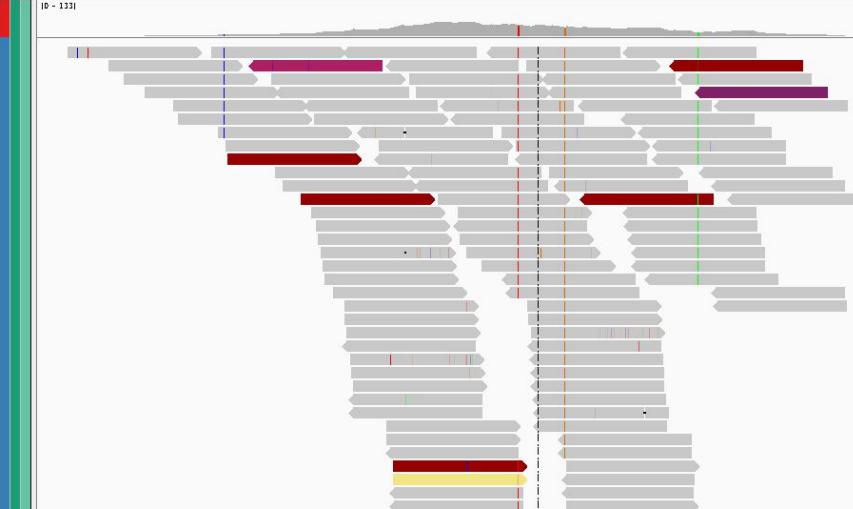
Đường số 10, Khu Công nghệ cao, Cầu Giấy, Hà Nội | Tel: 84-4 3747 2258 | Fax: 84-4 3747 2259

Đường số 10, Khu Công nghệ cao, Cầu Giấy, Hà Nội | Tel: 84-4 3747 2258 | Fax: 84-4 3747 2259

Nam Sài Gòn, Bình Chánh, TP. Hồ Chí Minh | Tel: 84-8 5431 8877 | Fax: 84-8 5431 8570

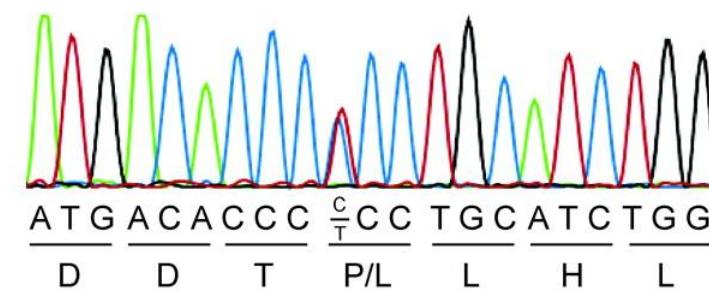
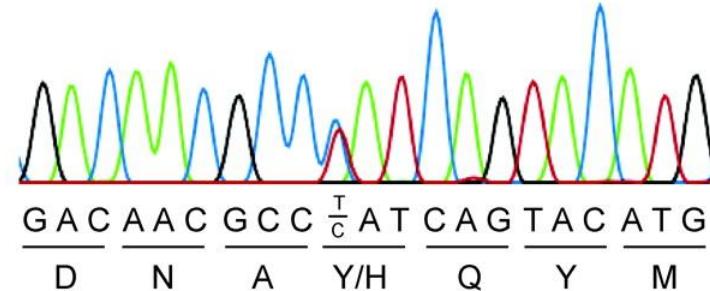
# Sanger analysis





A thick, orange, curved arrow pointing from the top left towards the bottom right, indicating a flow or transition.

# NGS analysis

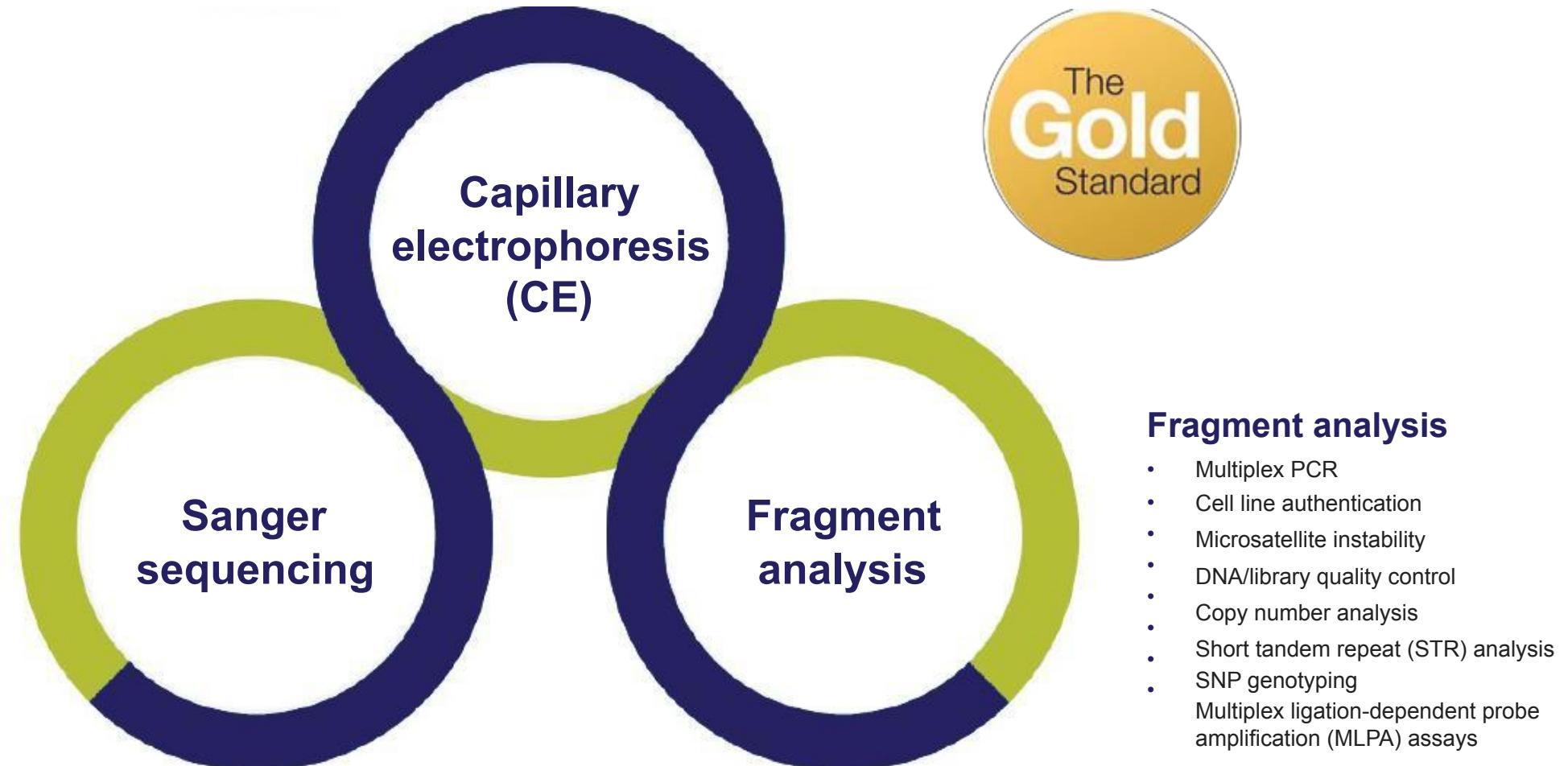


## Reference sequence

# Applications of today and tomorrow

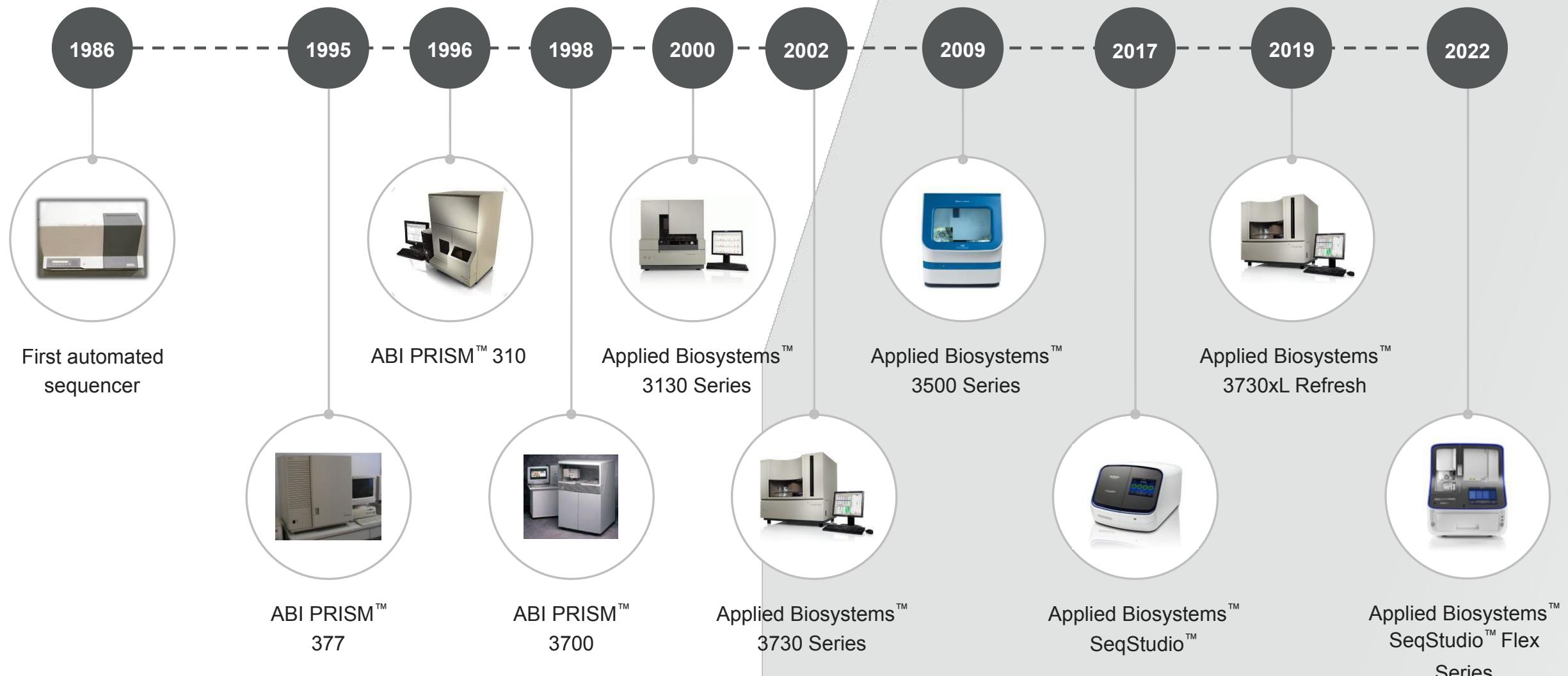
Capillary electrophoresis (CE) gold-standard technology

Tập trung vào độ phân giải cao trên từng single - base cho dù là mẫu khó



# History of Applied Biosystems™ genetic analyzers

Dedicated to advancing Sanger sequencing and fragment technology



# Applied Biosystems™ genetic analyzer portfolio

ThermoFisher  
SCIENTIFIC



**SeqStudio Flex Series Genetic Analyzer**

**SeqStudio Genetic Analyzer**

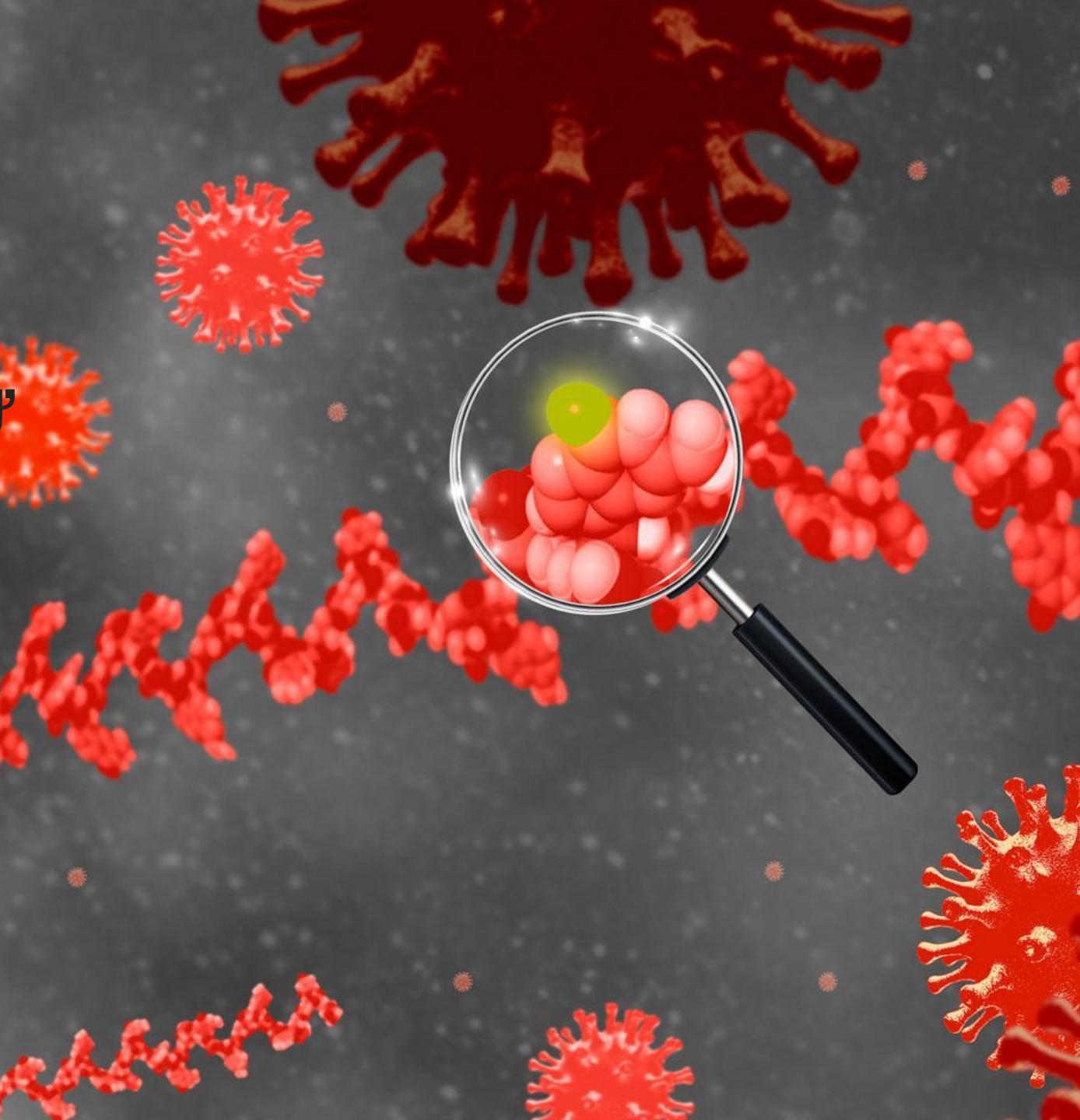
**3500 Series Genetic Analyzer**

**Refreshed 3730 Series Genetic Analyzer**

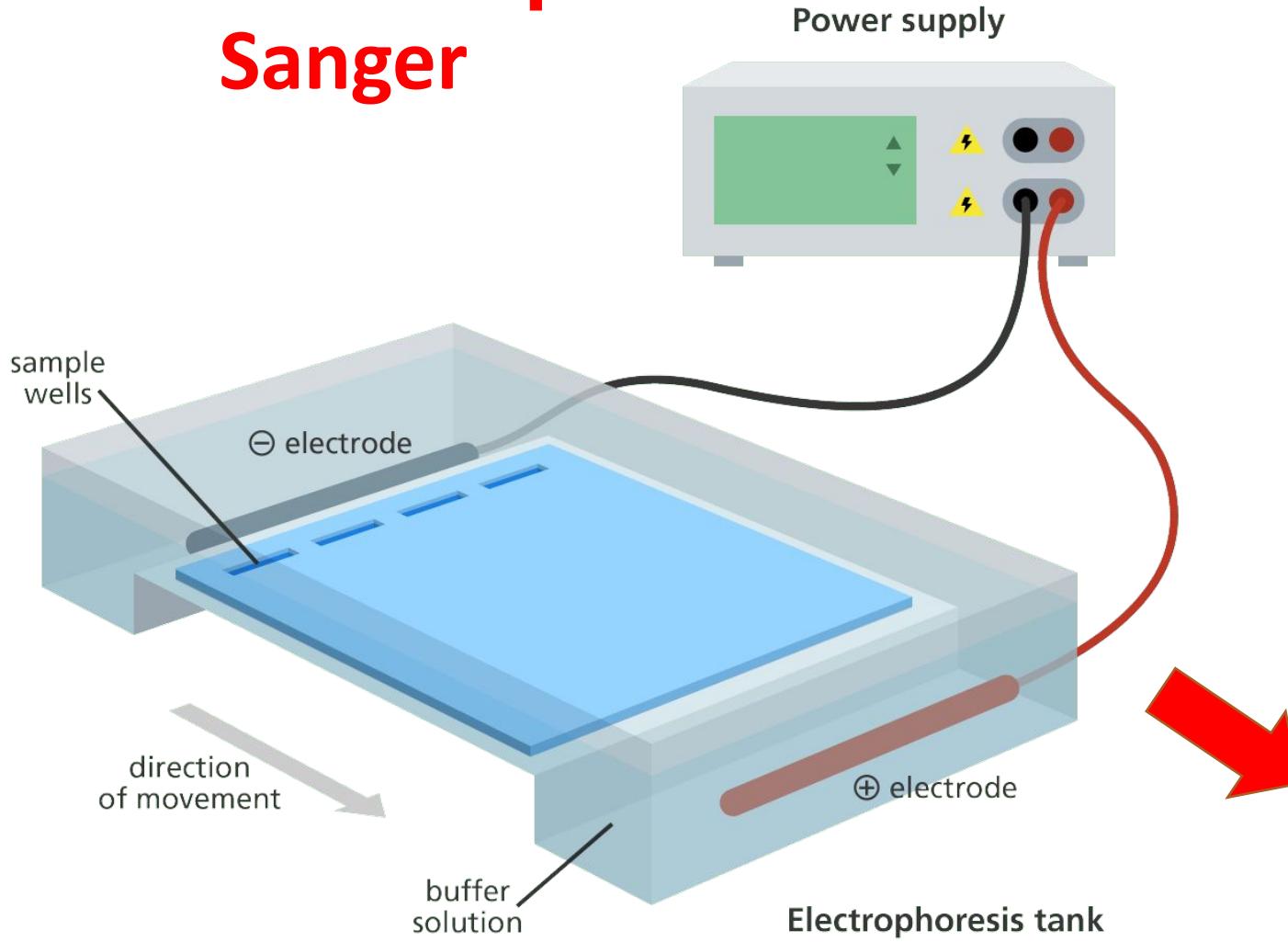
<b>Number of capillaries</b>	8 or 24	4	8 or 24	48 or 96
<b>Capillary array length (cm)</b>	36, 50	28	36, 50	36, 50
<b>Sample capacity</b>	4 plates; 96- and 384-well plate; 8-strip tube compatible	1 plate; 96-well plate; 8-strip tube compatible	2 plates; 96- and 384-well plate; 8-strip tube compatible	16 plates; 96- and 384-well plate
<b>Continual plate loading</b>	Yes	Not applicable	No	No
<b>Sample reprioritization</b>	Yes	No	Yes	No
<b>RFID tags</b>	Yes		Yes	No
<b>Remote monitoring</b>	Yes	Yes	No	No
<b>Consumables</b>	Ready-to-use 3500/SeqStudio Flex, enhanced array housing	All-in-one cartridge	Ready-to-use 3500/ seqStudio Plex 3500 array	Polymer bottle, mixing buffer
<b>Connectivity</b>	USB, Ethernet ports, and Wi-Fi dongle	USB, Ethernet ports, and Wi-Fi dongle	Ethernet port	Ethernet port

# NGUYÊN LÝ GIẢI TRÌNH TỰ

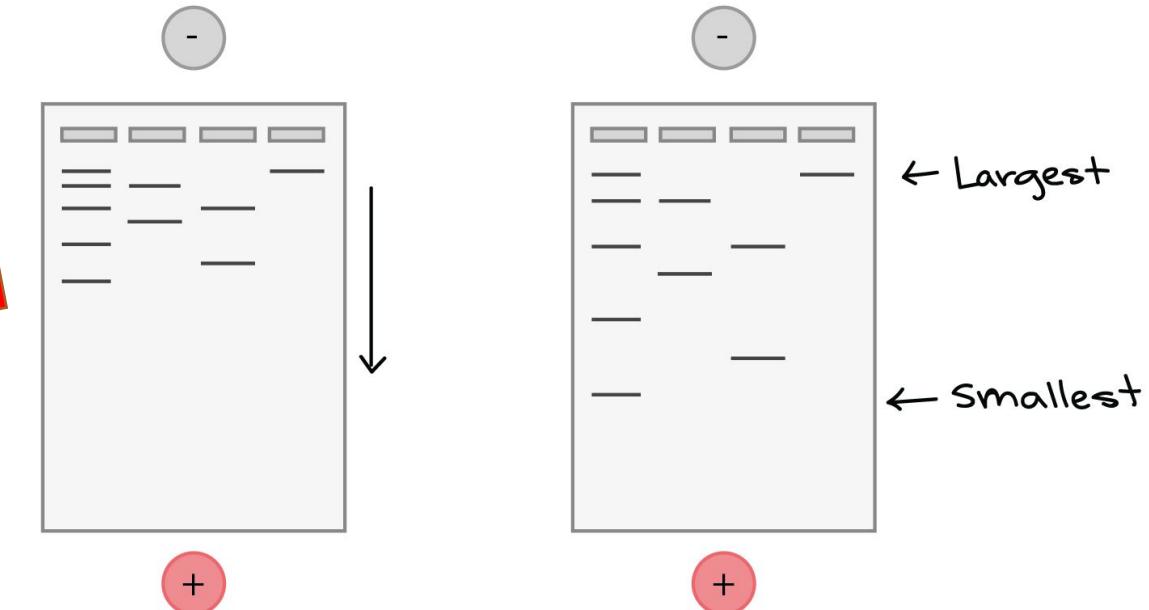
■ The world leader in serving science



# Giải trình tự Sanger

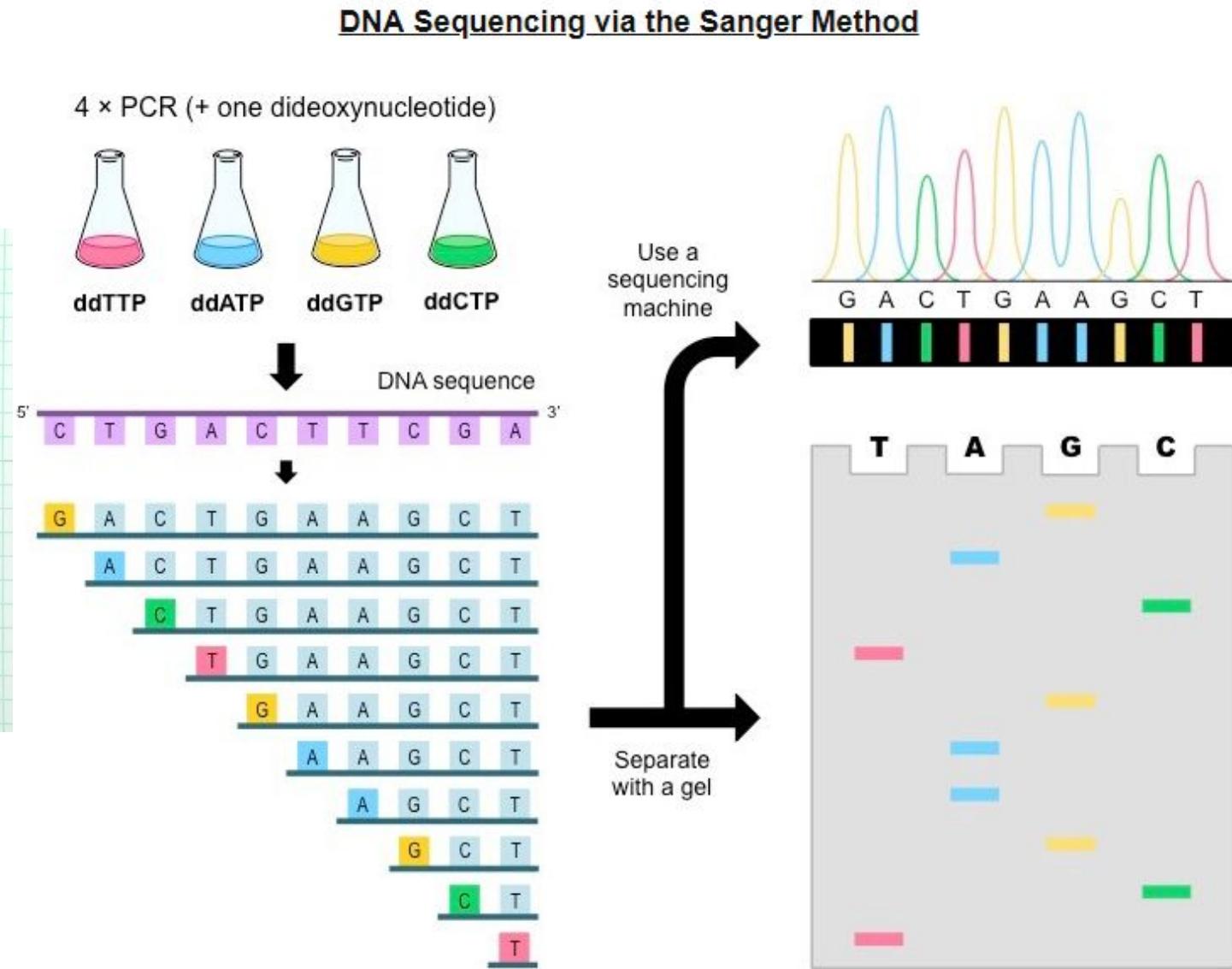
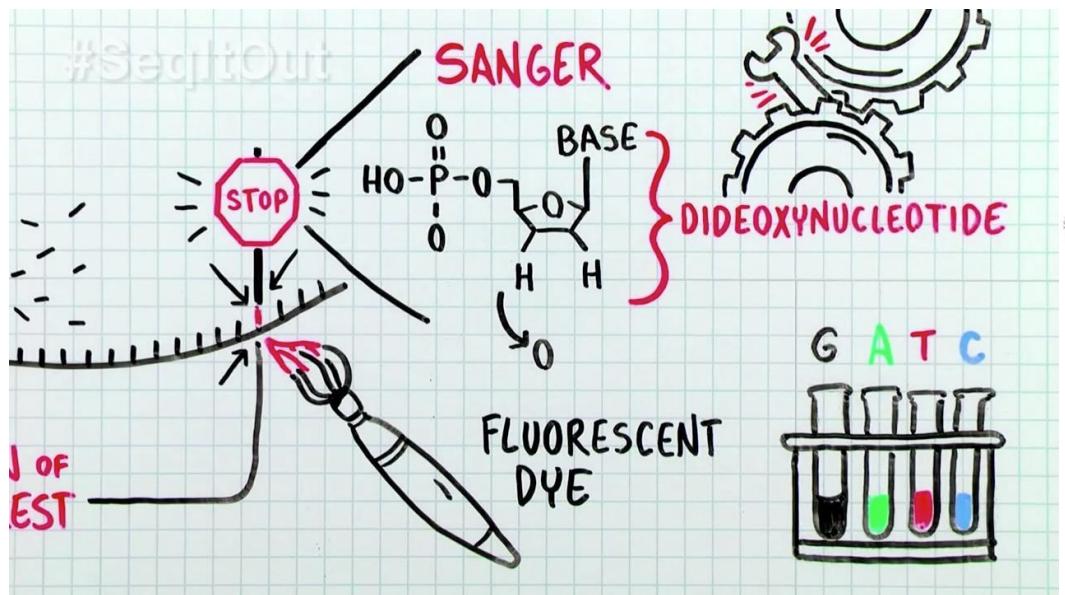


Dựa trên nguyên lý điện di  
gel agarose



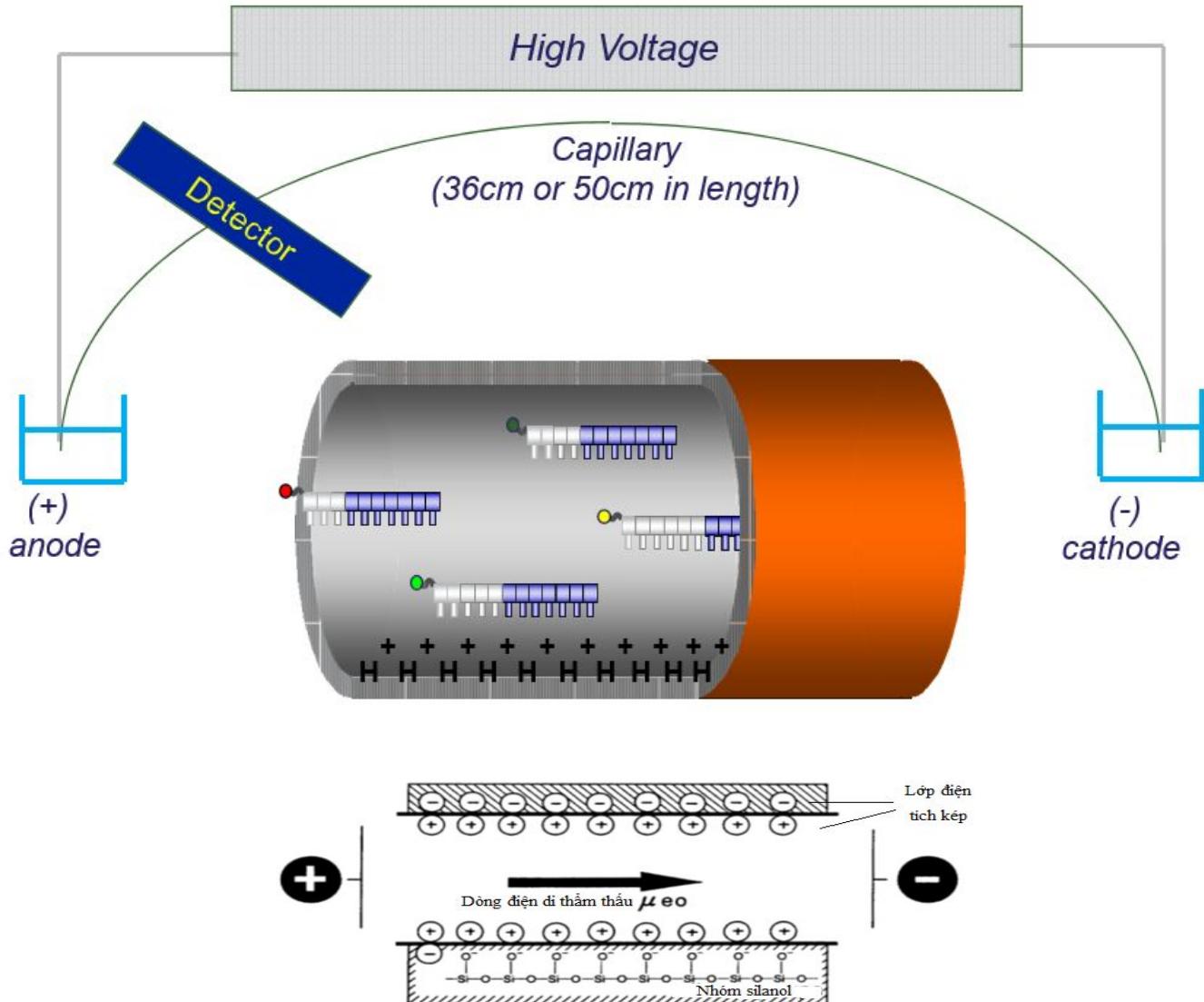
DNA fragments  
migrate through gel.

The fragments are  
separated by size.

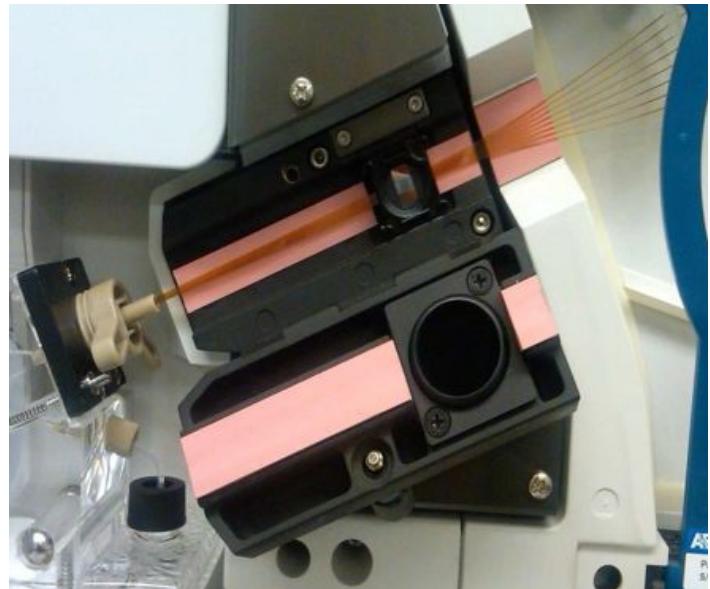


# NGUYÊN LÝ CỦA PHƯƠNG PHÁP ĐIỆN DI MAO QUẢN

- Diễn ra trong một mao quản có đường kính rất nhỏ ( $\sim 75\text{um}$ )
- Dung dịch đệm cho dòng điện chạy liên tục trong mao quản từ cực (+) sang cực (-)
- Khi có điện thế, trong mao quản sẽ xuất hiện điện trường
- Các phân tử tích điện sẽ di chuyển dưới ảnh hưởng của điện trường
- Các mẫu được phân tách nhờ sự khác nhau về **tỷ lệ khối lượng/ điện tích**
- Thành trong của mao quản được thiết kế để hạn chế hiệu ứng của dòng điện thẩm tách (EOF)
- Sử dụng gel để phân tách

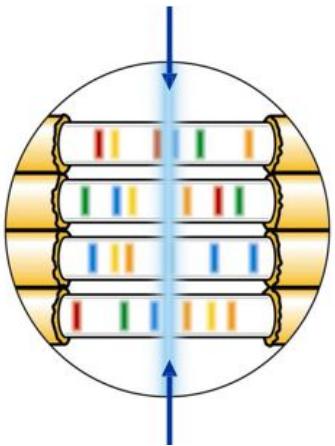


## Làm sao dữ liệu trình tự thô có thể chuyển sang dạng tín hiệu số?

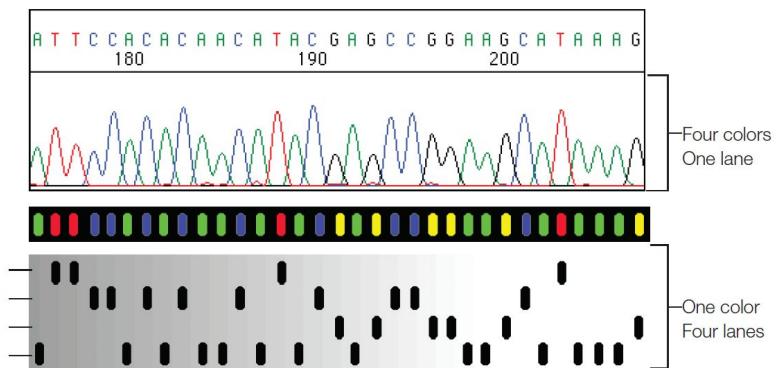
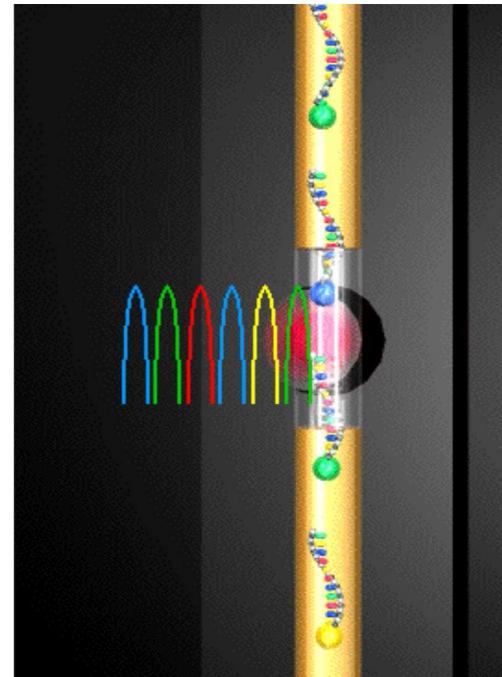


Thuốc nhuộm huỳnh quang gắn vào đầu mỗi đoạn DNA bị kích thích bởi laser khi đi qua Detector

Phổ thu được của mỗi loại thuốc nhuộm được thu nhận bởi CCD camera và chuyển sang dạng tín hiệu số

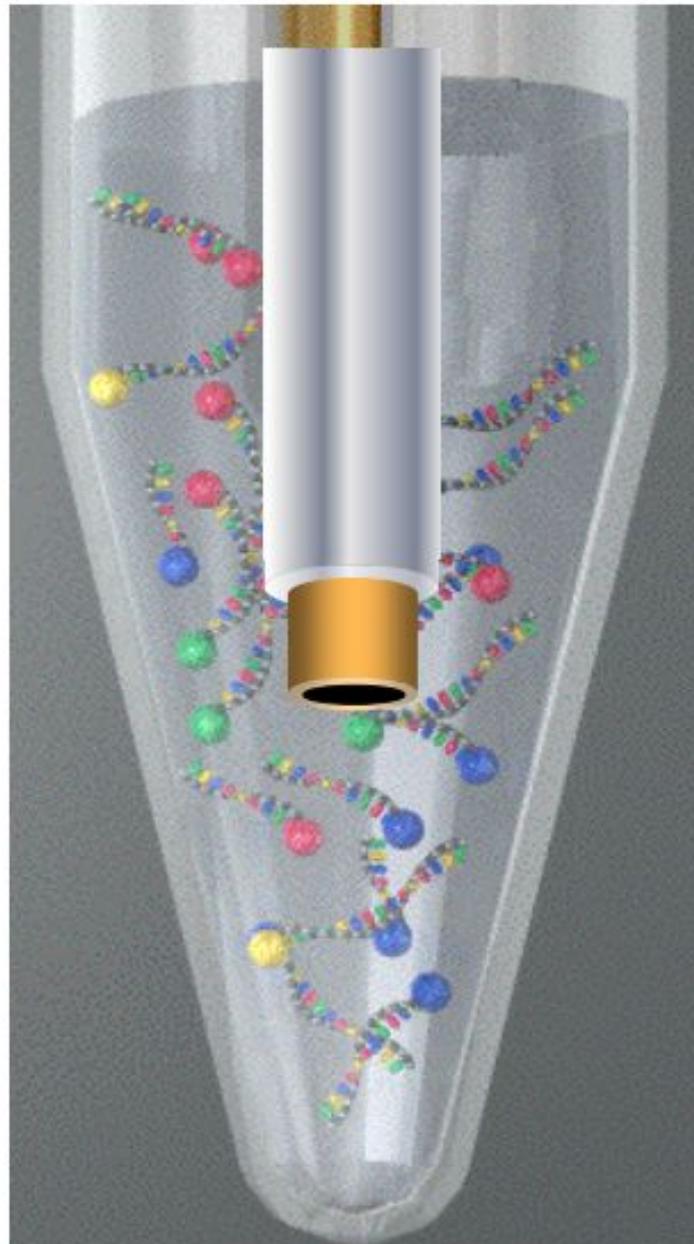


Các mảnh nhỏ hơn đi qua detector được phát hiện trước các fragment có kích thước lớn hơn



Fluorescent sequencing compared with radioactive sequencing.

# Electrokinetic Injection and Electrophoresis



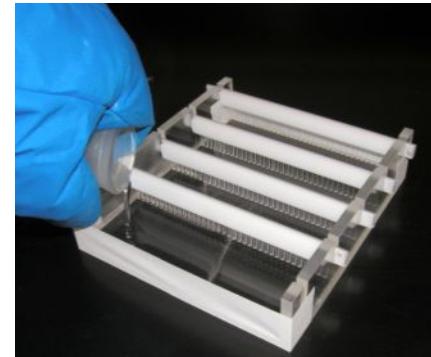
1. Capillary and electrode are placed into the sample
2. Voltage is applied
3. “-” charged DNA enters the capillary as it migrates toward the “+” electrode at the other end of the capillary
4. Contaminating ions will compete for injection with your sequencing products!!!
5. No Reduction in Sample Volume
6. Injection is directly affected by voltage and duration.

# Gel vs Capillary

Agarose



Gel handling



- Ready-to-use polymer

- Pre-packed

- PDMA

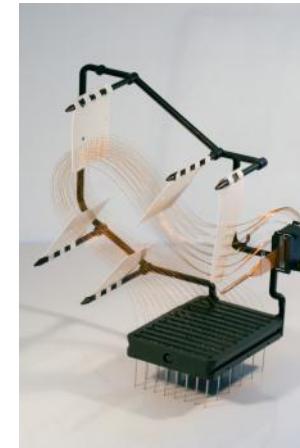


- Auto-fill capillary

- Program controlled

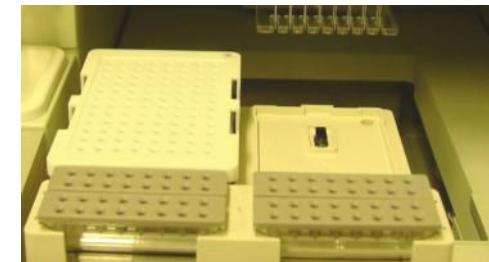
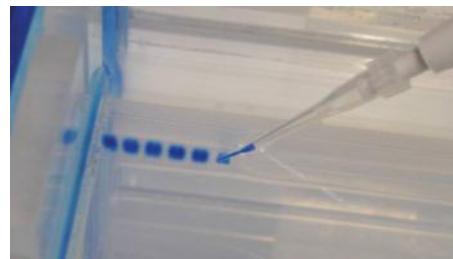
# Gel Ep vs Capillary Ep

EP carrier



- Fully automated
- Parallel processing

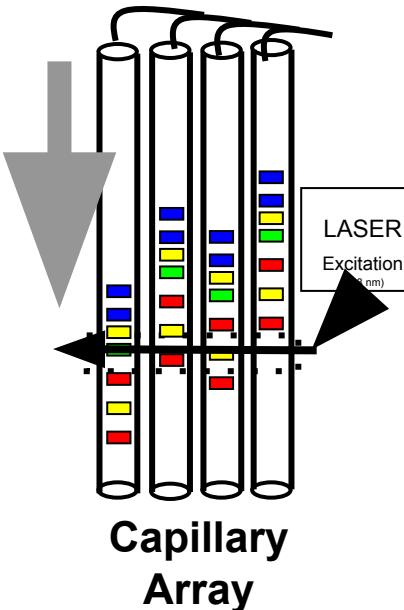
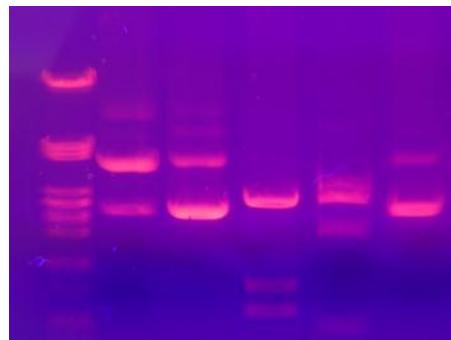
Sample Loading



- Auto sample injection
- Uninterrupted loading

# Gel vs Capillary

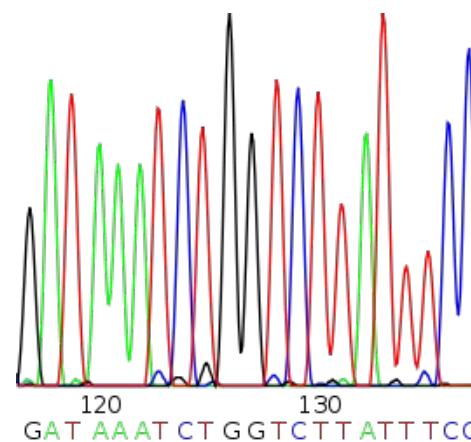
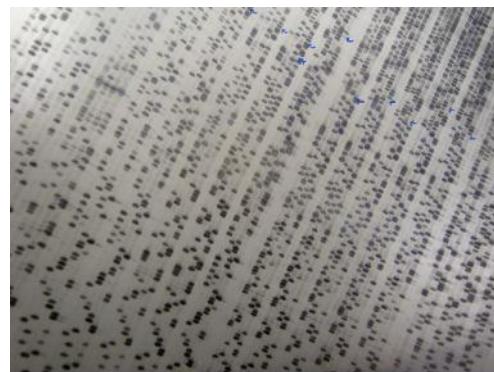
Detection



Capillary  
Array

- Fluorescence based
- Real-time detection

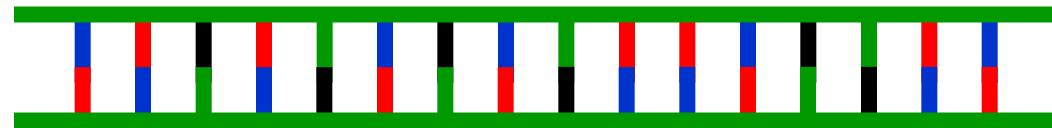
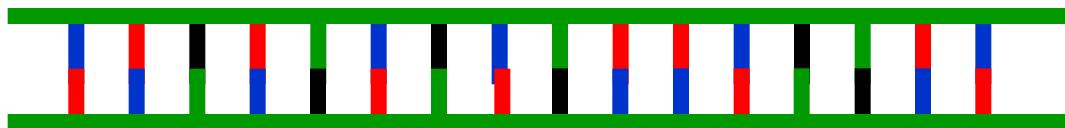
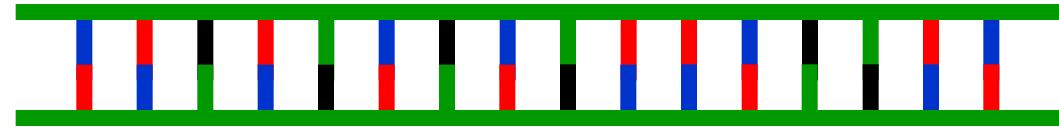
Data Storage,  
Analysis &  
Retrieval



- A/D convert on CCD
- Digitalized result

# Nguyên lý GTT Sanger

## DNA khuôn



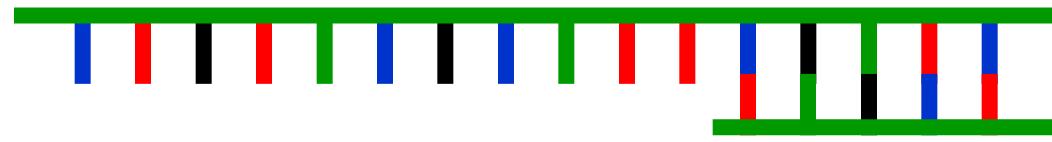
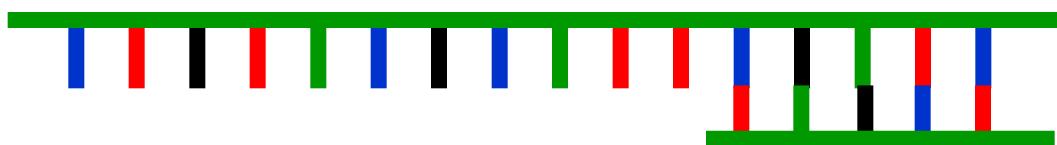
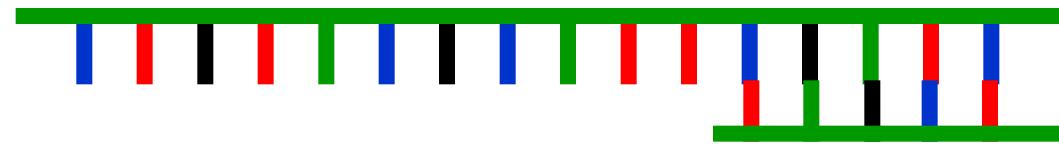
# Nguyên lý GTT Sanger

Biến tính



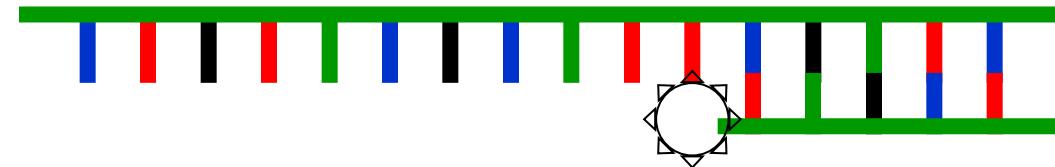
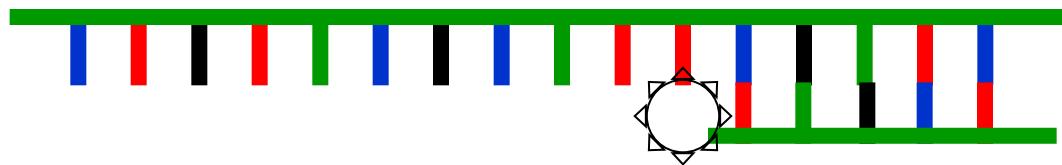
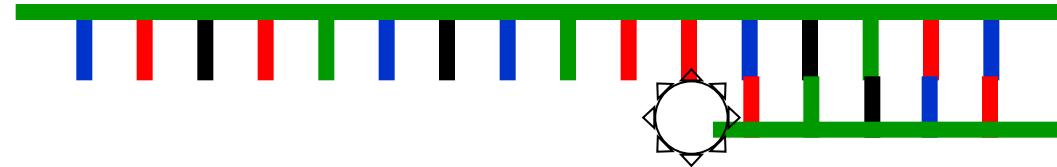
# Nguyên lý GTT Sanger

## Gắn môi



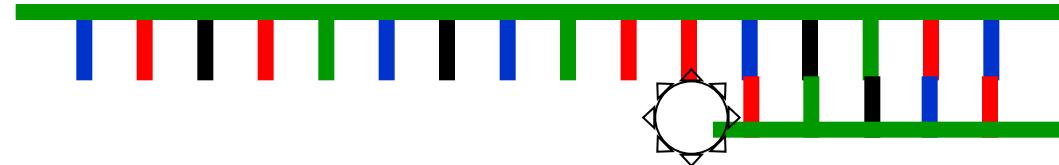
# Nguyên lý GTT Sanger

Kéo dài chuỗi

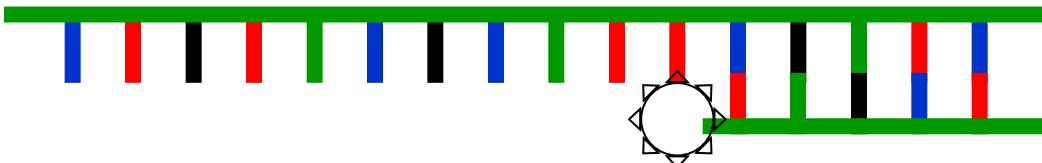
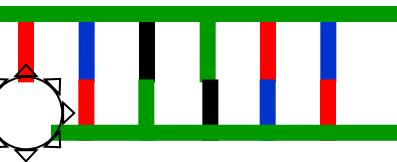


# Nguyên lý GTT Sanger

Kéo dài chuỗi

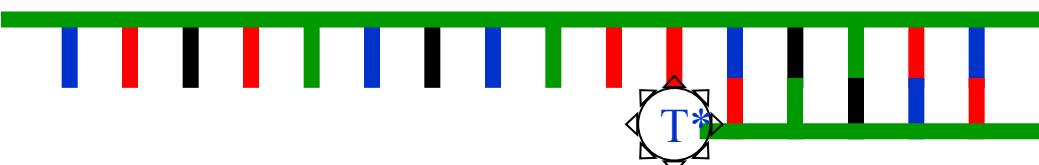
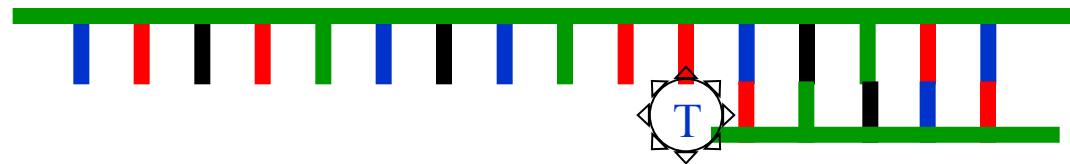
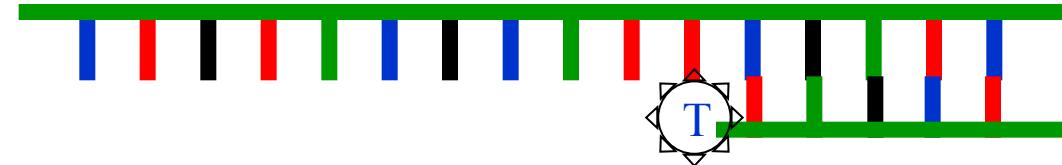


T      T\*      G  
      C  
A      A\*      C      A  
T      T\*      C      G  
G\*  
C\*      A\*      C      A  
A      T      T      G\*  
T      C\*      C



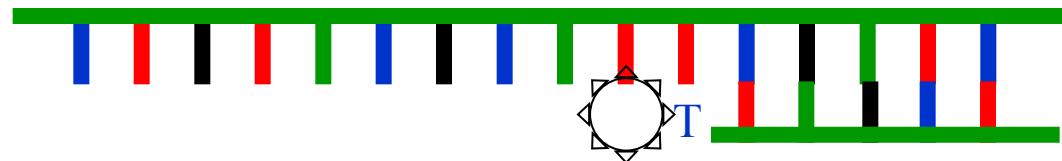
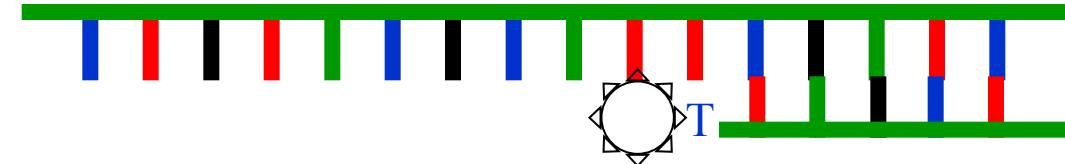
# Nguyên lý GTT Sanger

## Kéo dài chuỗi



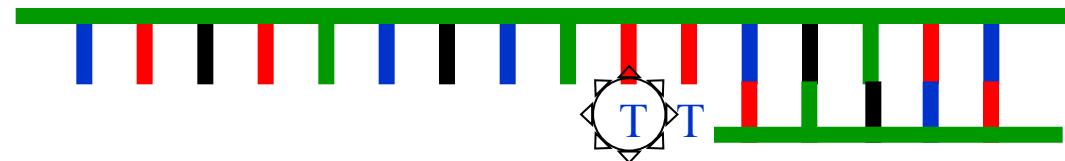
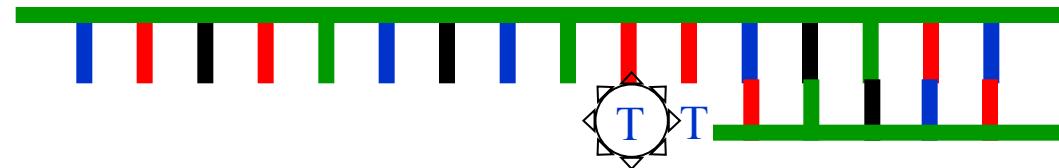
# Nguyên lý GTT Sanger

## Kéo dài chuỗi



# Nguyên lý GTT Sanger

Kéo dài chuỗi



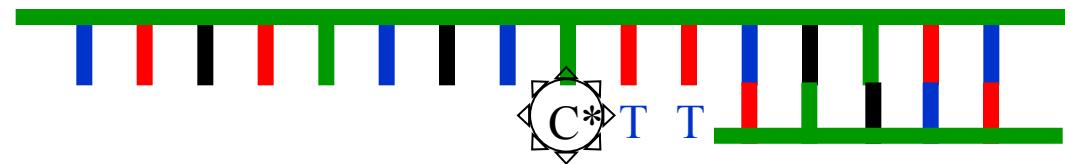
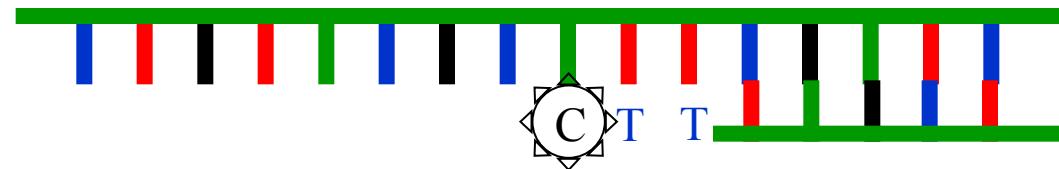
G  
C  
A\* T\* C A  
A T G\*  
C\* A\* C A  
A T G\*  
T C\* C



T\*

# Nguyên lý GTT Sanger

Kéo dài chuỗi

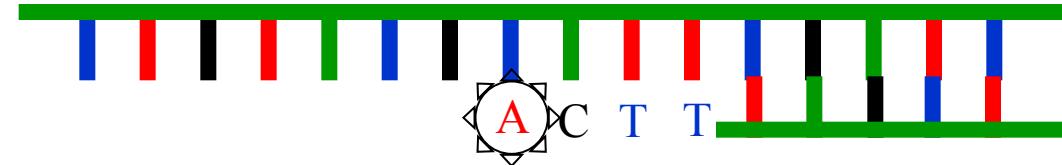


G  
C  
A\*  
A  
T\*  
G  
C\*  
A\*  
C  
A  
T  
G\*  
C  
T  
G\*  
C



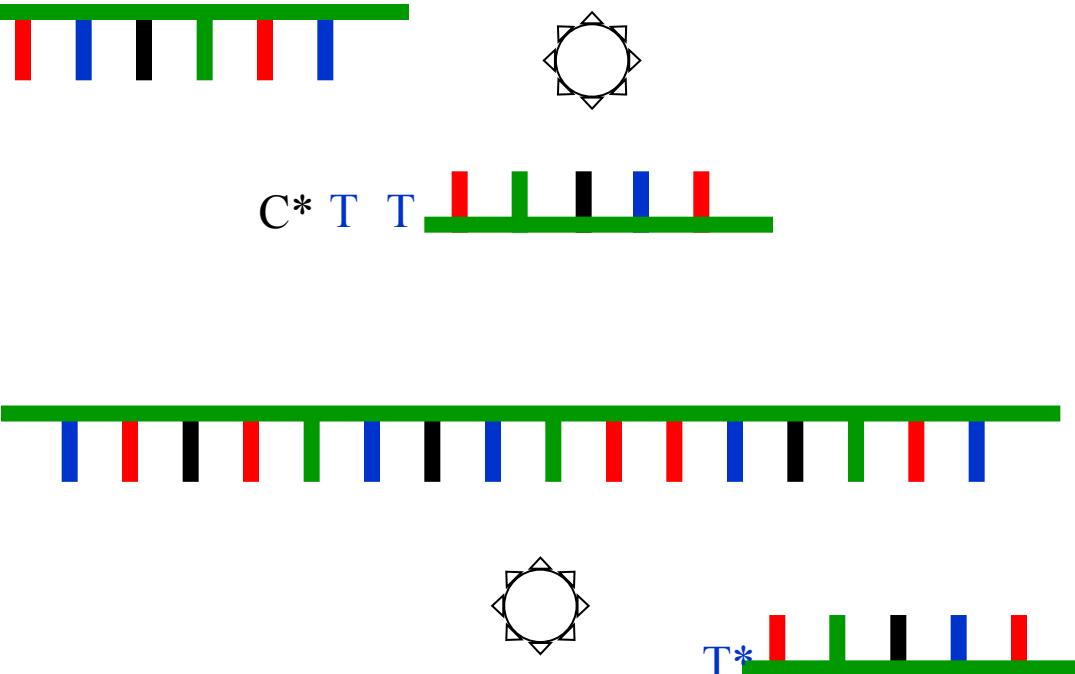
# Nguyên lý GTT Sanger

## Kéo dài chuỗi



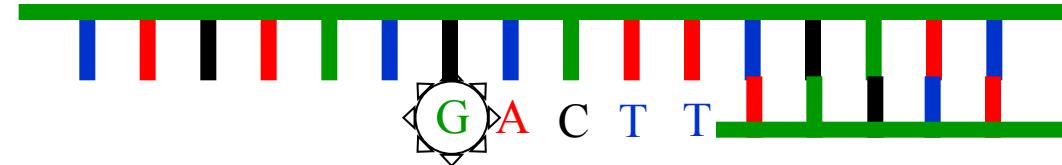
A 4x4 grid of letters where each row and column contains a unique sequence of A, T, C, and G.

		G	
	C		
A*			
A	T*		G
C*	A*	C	A
A	T	T	G*
T	C	C	



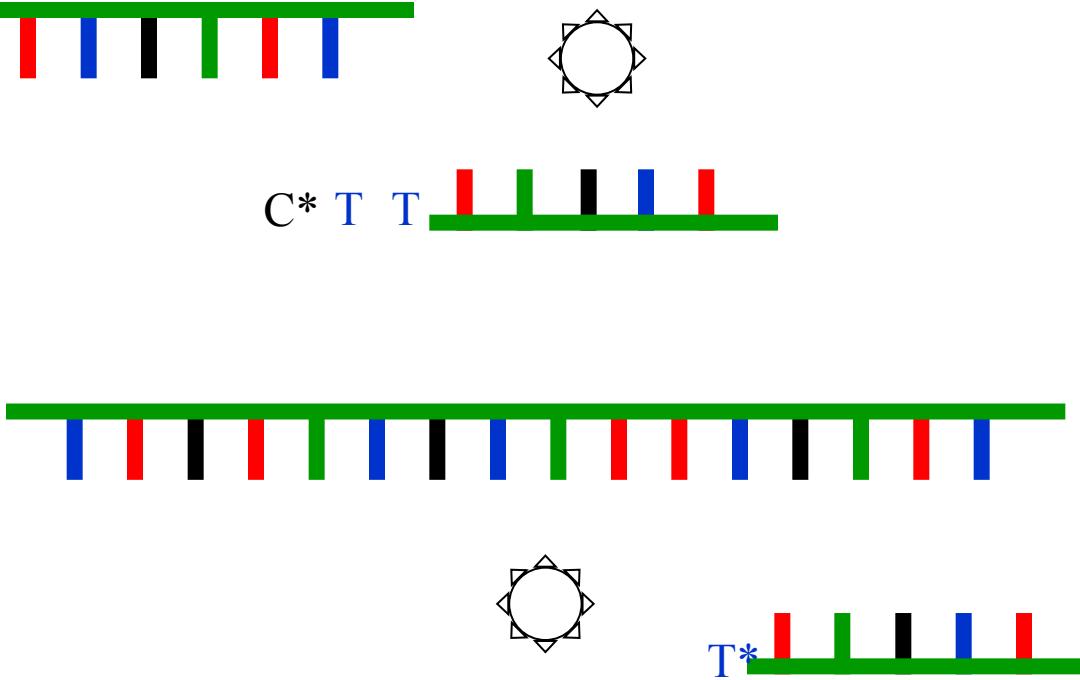
# Nguyên lý GTT Sanger

## Kéo dài chuỗi



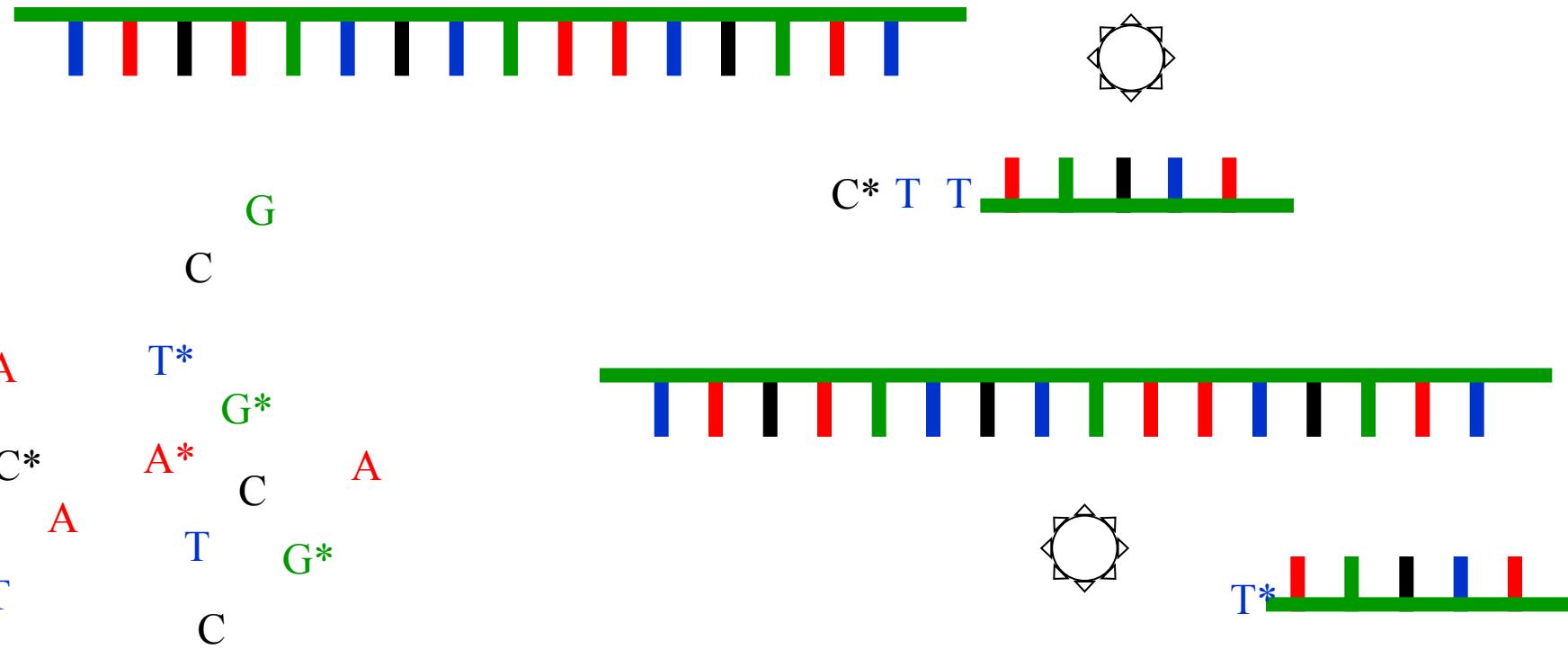
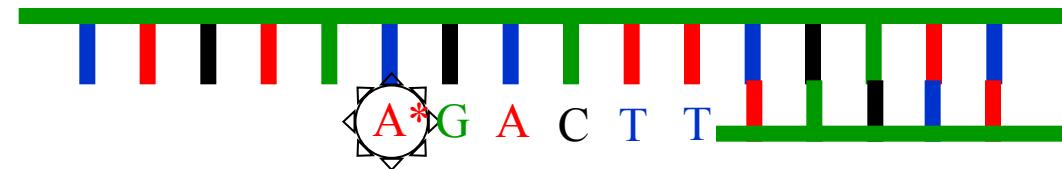
A 4x4 grid of letters where each row and column contains a unique sequence of A, T, C, and G.

		G	
	C		
A*			
A	T*		
C*	A*		A
A		C	
T	T	G*	
	C		



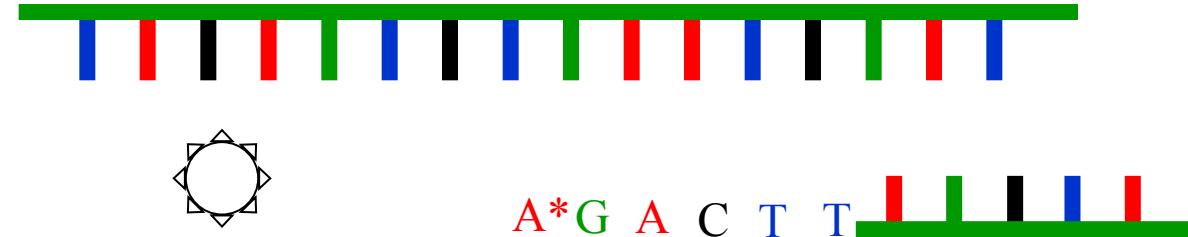
# Nguyên lý GTT Sanger

Kéo dài chuỗi



# Nguyên lý GTT Sanger

# Kéo dài chuỗi

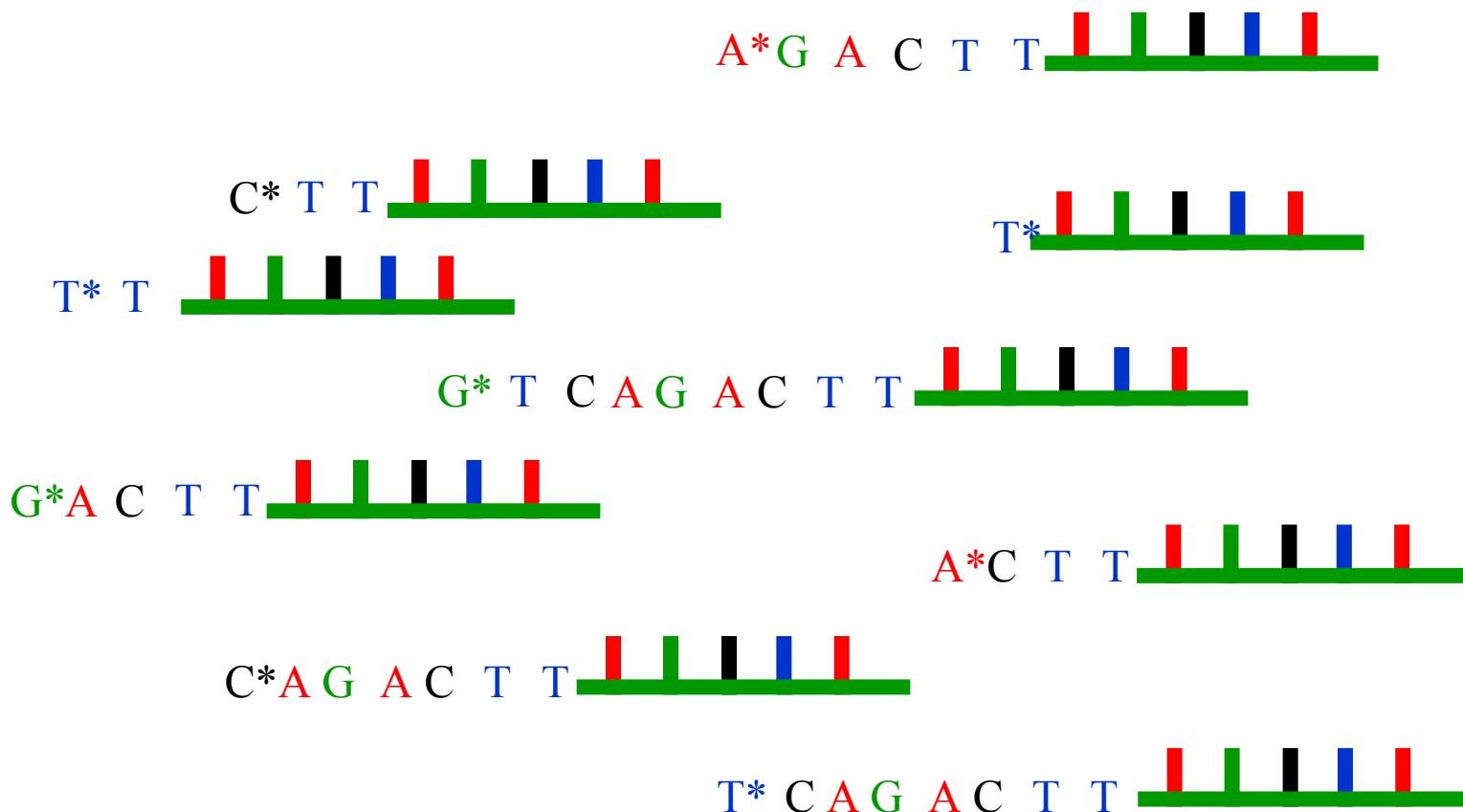


G  
C

A T\* G\*  
C\* A\* C A  
T T G\*  
C C

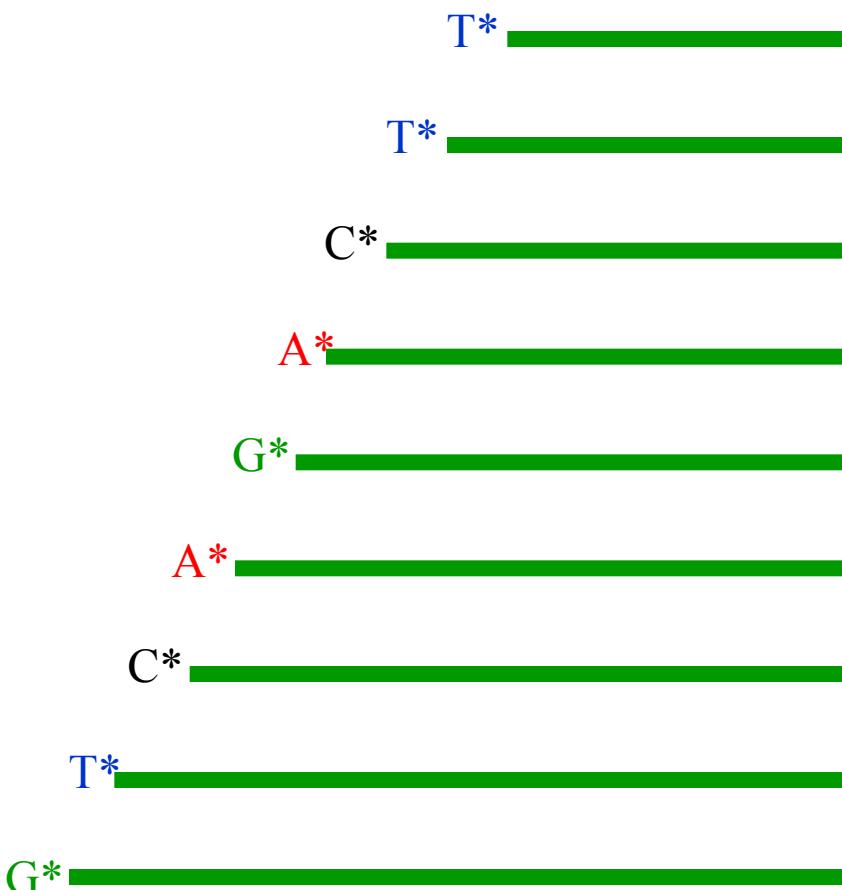
# Nguyên lý GTT Sanger

Kết thúc phản ứng

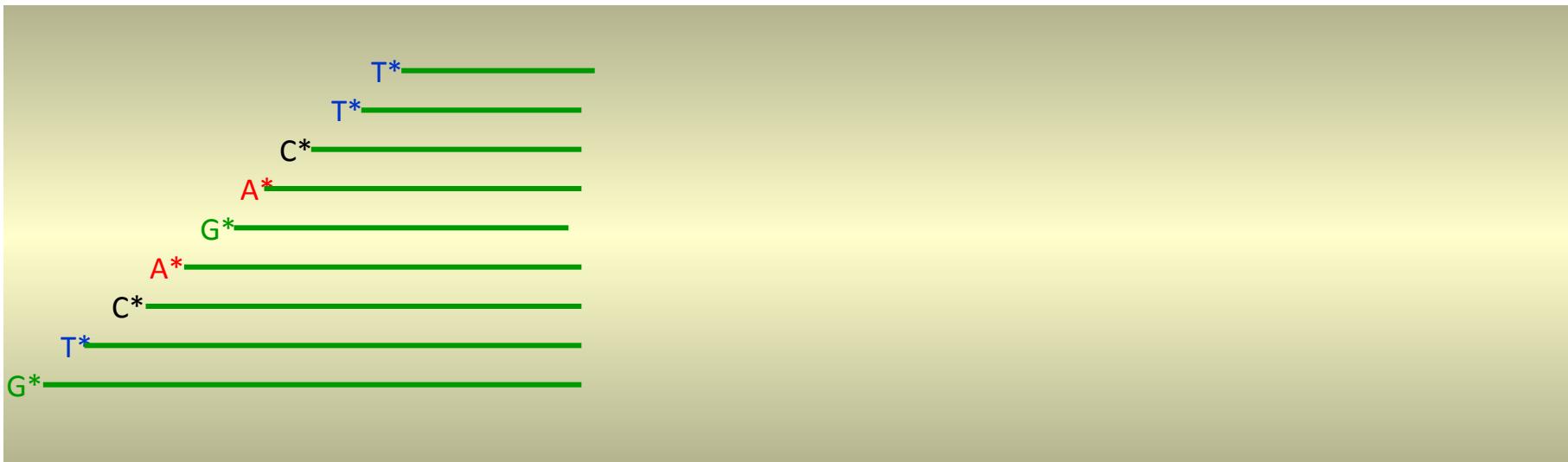


# Nguyên lý GTT Sanger

Kết thúc phản ứng



# Nguyên lý GTT Sanger

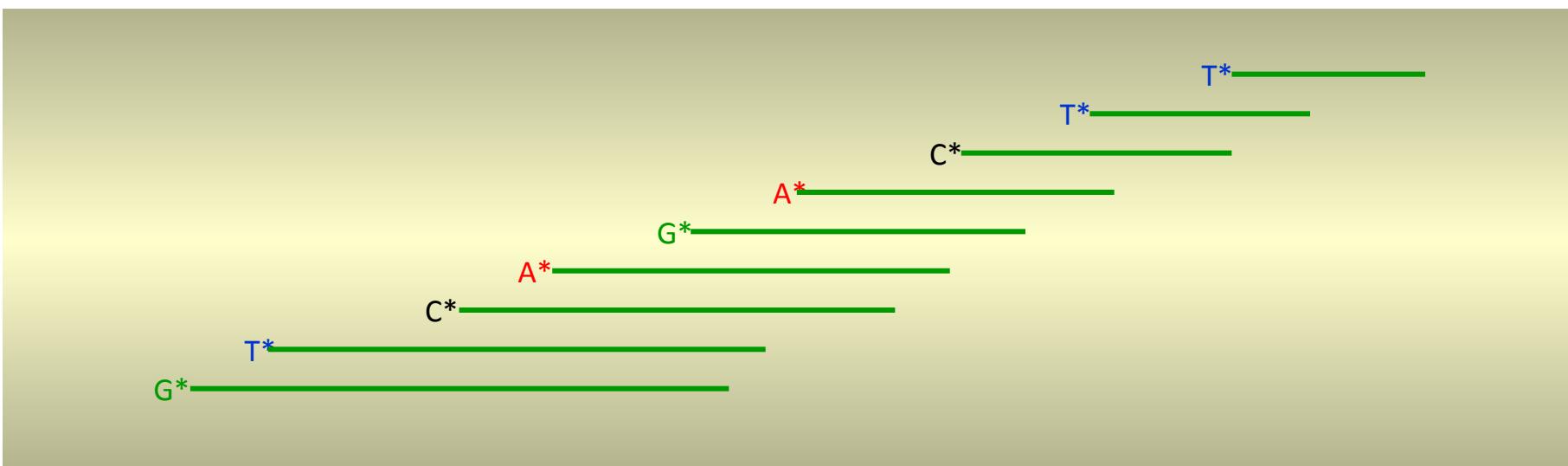


- Quá trình điện di: ADN sẽ di chuyển trong điện trường.
- Sợi có kích thước ngắn sẽ di chuyển nhanh hơn sợi có kích thước dài.

—

+

# Nguyên lý GTT Sanger

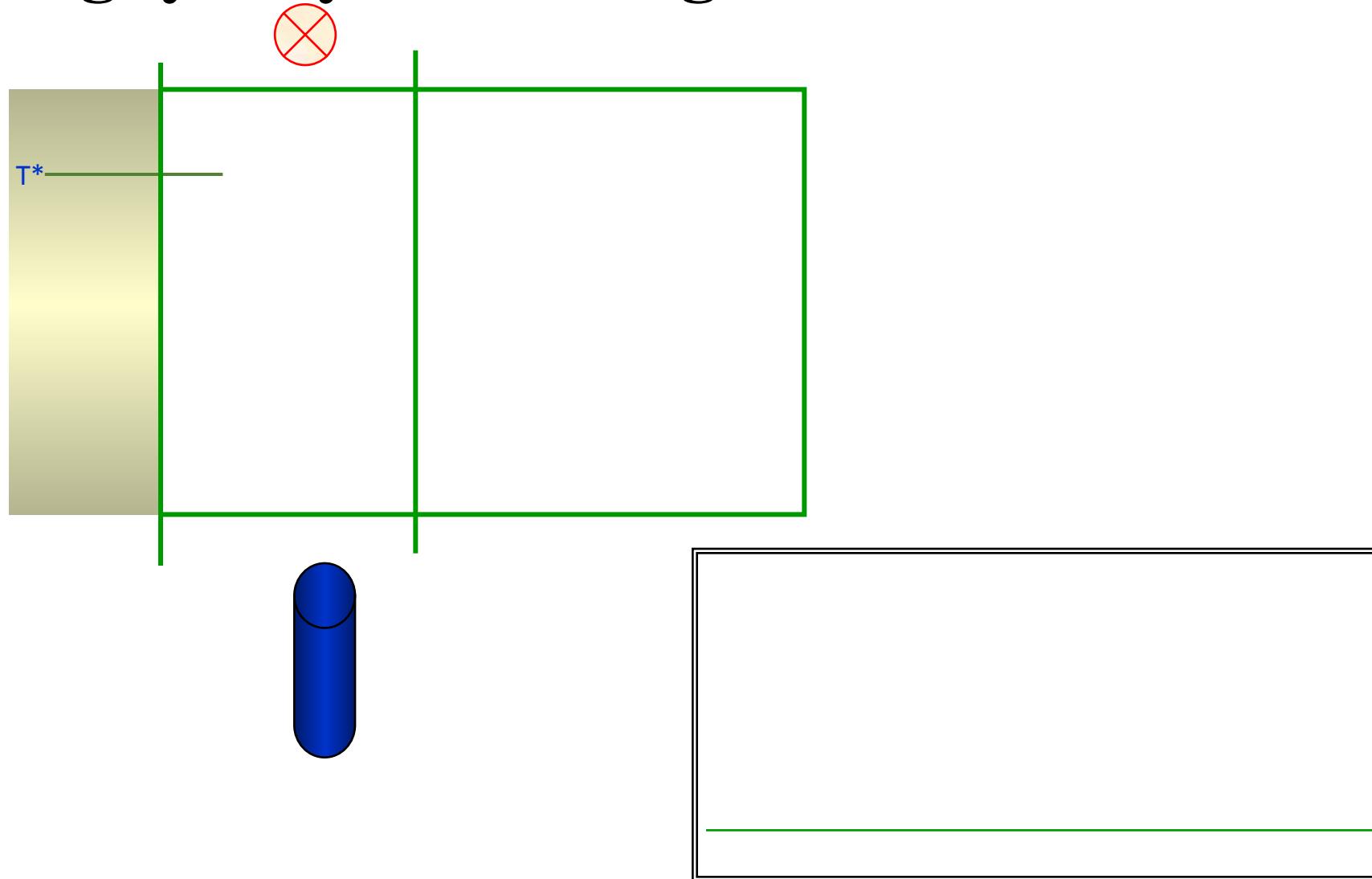


-

+

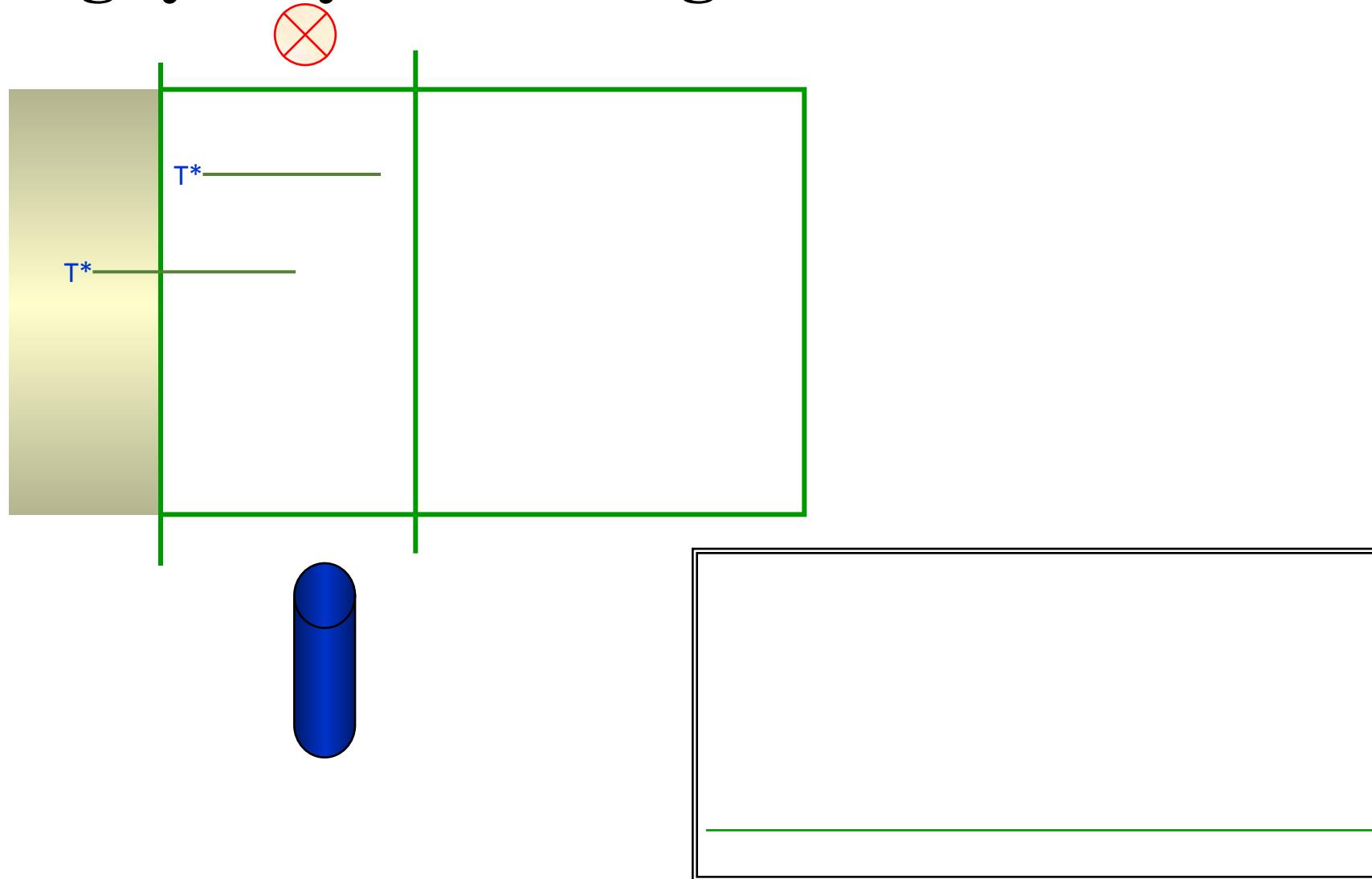
- Quá trình điện di: ADN sẽ di chuyển trong điện trường.
- Sợi có kích thước ngắn sẽ di chuyển nhanh hơn sợi có kích thước dài.

# Nguyên lý GTT Sanger



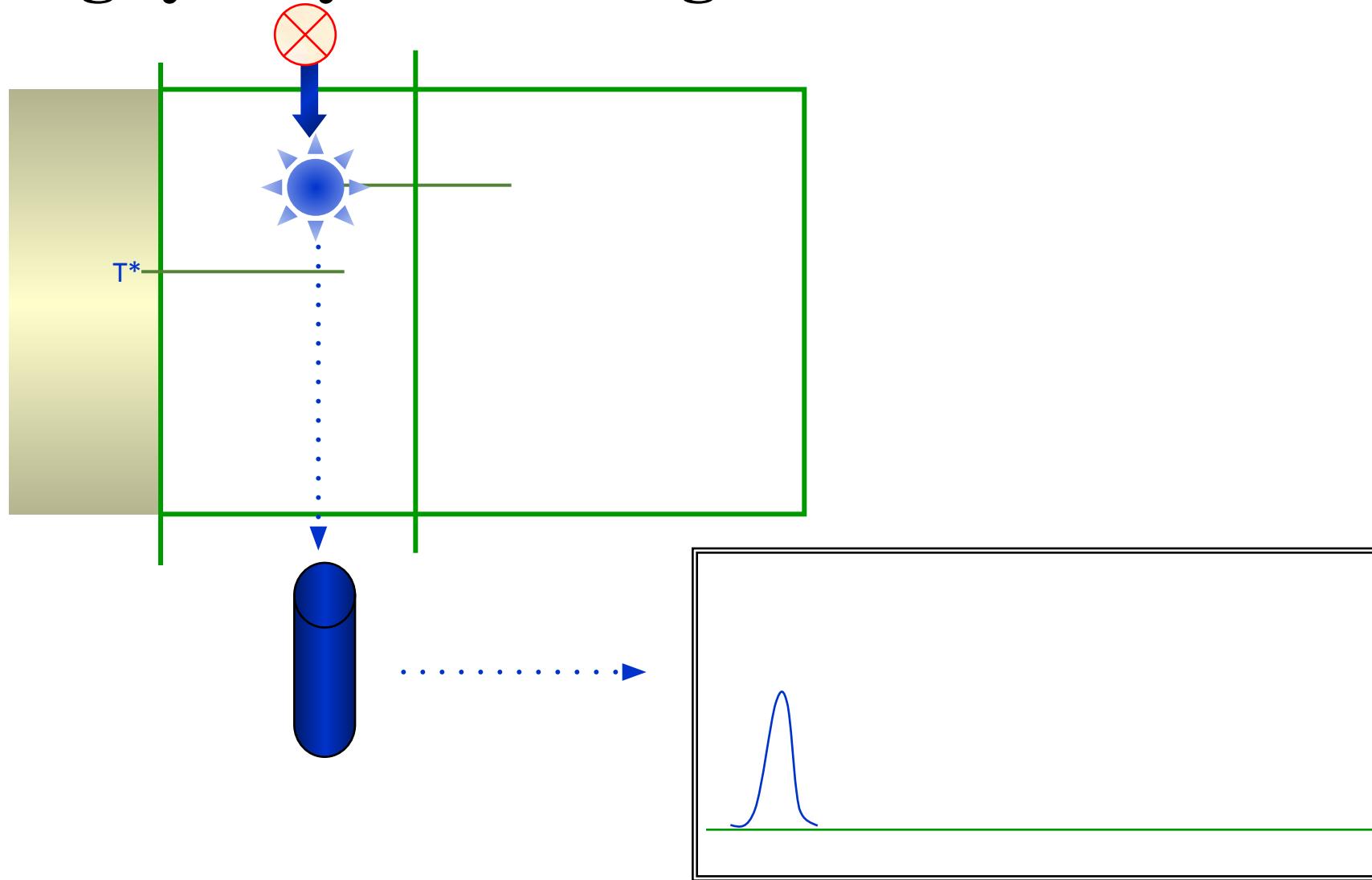
- Sử dụng huỳnh quang để phát hiện các sợi ADN có kích thước dài ngắn khác nhau.

# Nguyên lý GTT Sanger



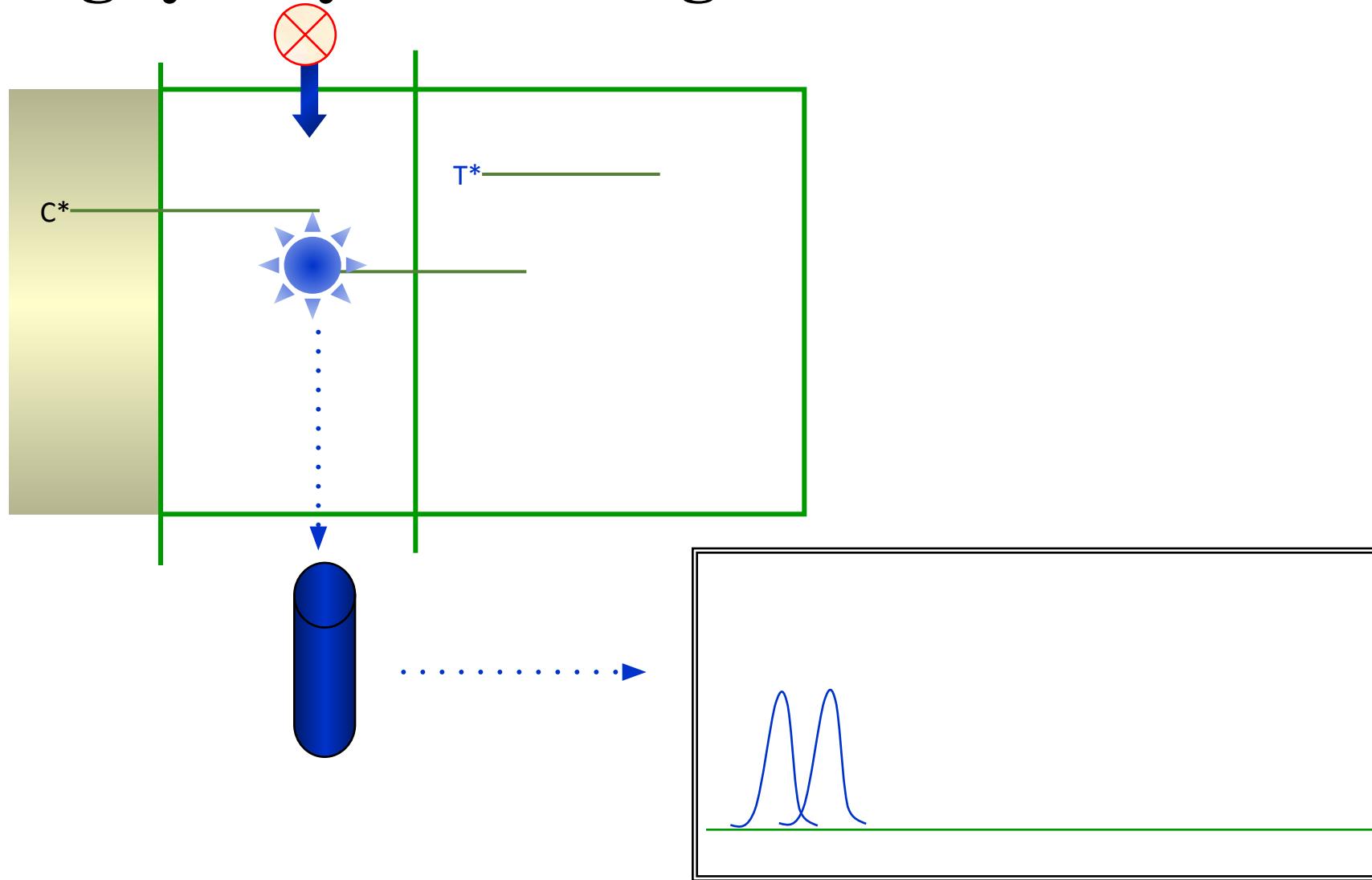
- Sử dụng huỳnh quang để phát hiện các sợi ADN có kích thước dài ngắn khác nhau.

# Nguyên lý GTT Sanger



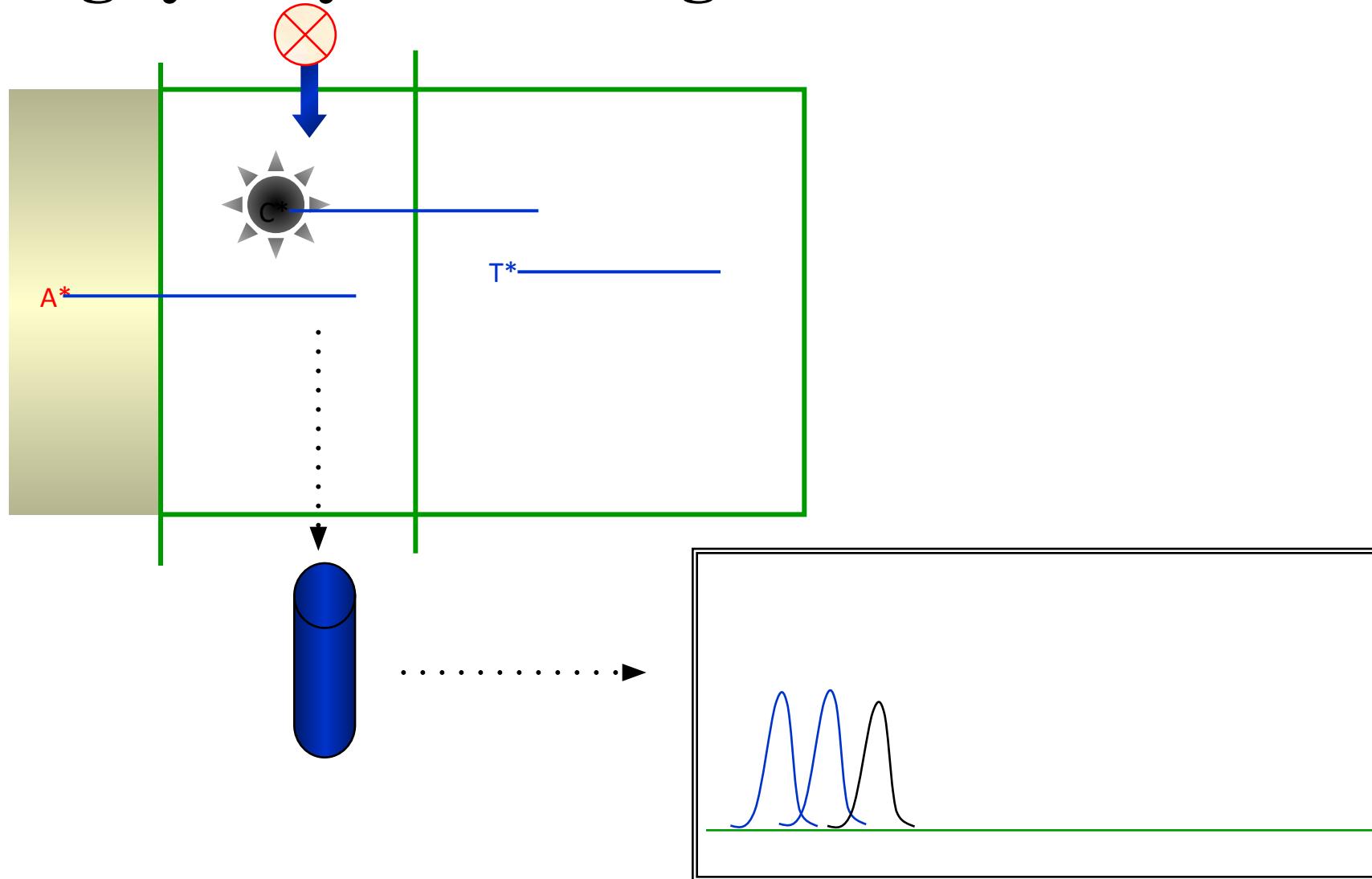
- Sử dụng huỳnh quang để phát hiện các sợi ADN có kích thước dài ngắn khác nhau.

# Nguyên lý GTT Sanger



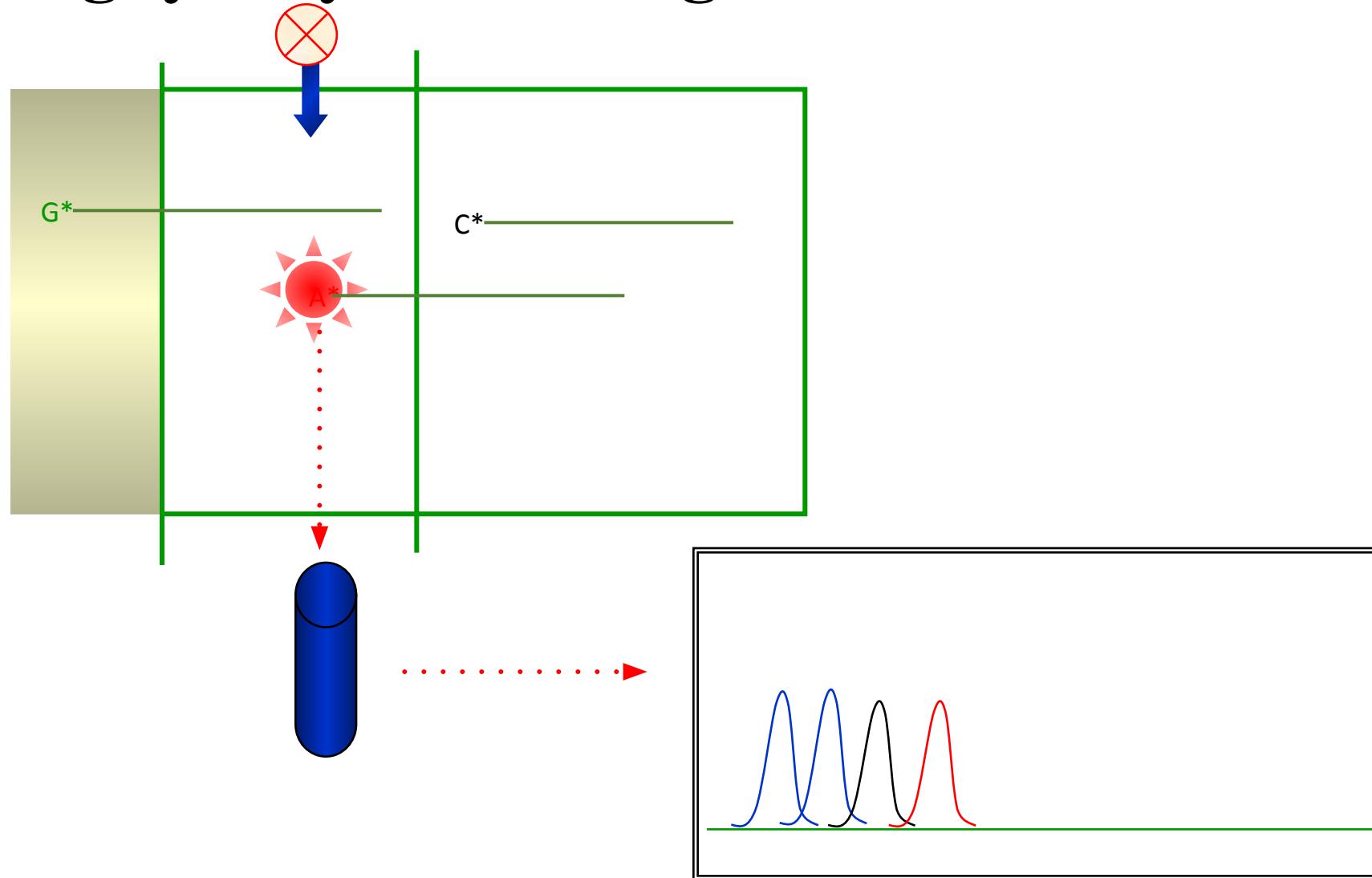
- Sử dụng huỳnh quang để phát hiện các sợi ADN có kích thước dài ngắn khác nhau.

# Nguyên lý GTT Sanger



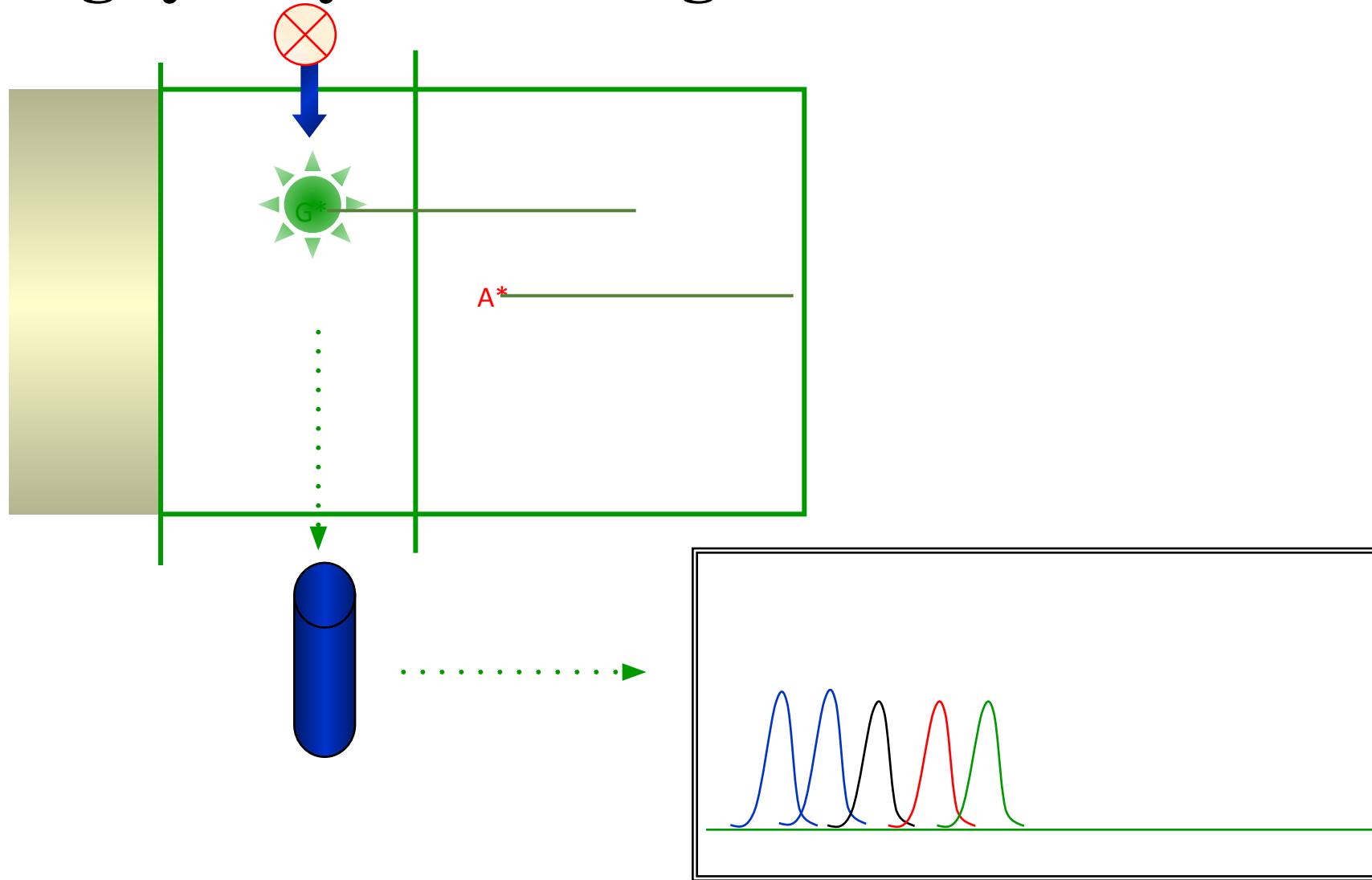
- Sử dụng huỳnh quang để phát hiện các sợi ADN có kích thước dài ngắn khác nhau.

# Nguyên lý GTT Sanger



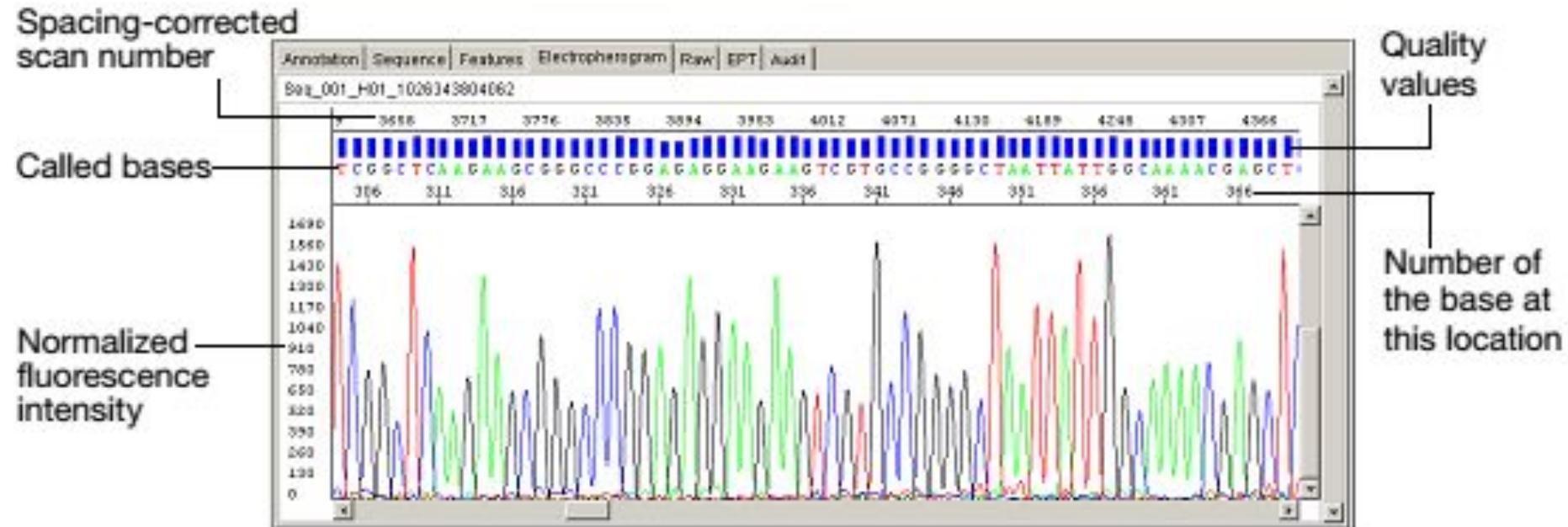
- Sử dụng huỳnh quang để phát hiện các sợi ADN có kích thước dài ngắn khác nhau.

# Nguyên lý GTT Sanger



- Sử dụng huỳnh quang để phát hiện các sợi ADN có kích thước dài ngắn khác nhau.

# Kết quả của giải trình tự



## AB 3500 Genetics Analyzer

### Ứng dụng

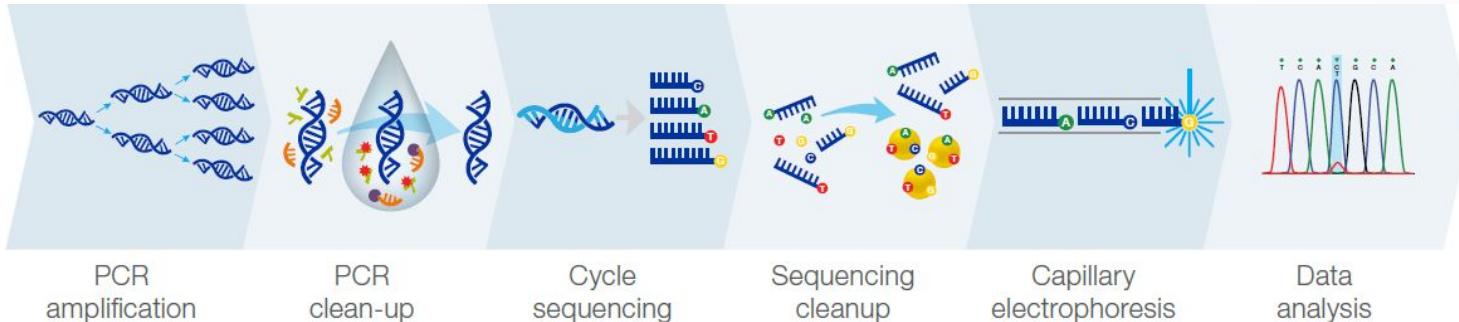
Giải trình tự

Phân tích đoạn



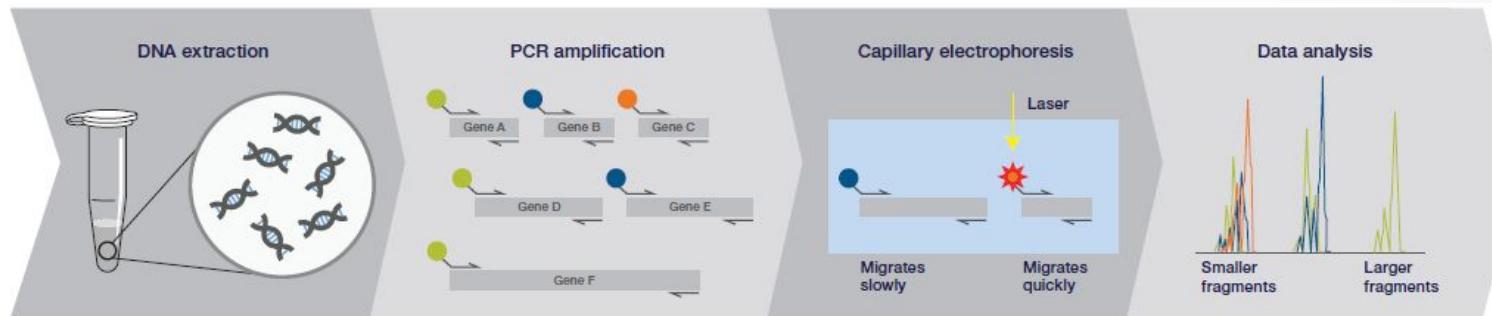
# ỨNG DỤNG CÔNG NGHỆ CE

## Sanger sequencing workflow



- Tiêu chuẩn vàng cho khẳng định các biến thể
- **Rẻ - nhanh – dễ**
- Phát hiện biến thể độ nhạy 5%
- Xác nhận NGS variants với độ chính xác 99.99%
- Đoạn dài tối 1,000 bp
- Phân tích dễ và nhanh hơn NGS

## Fragment analysis workflow

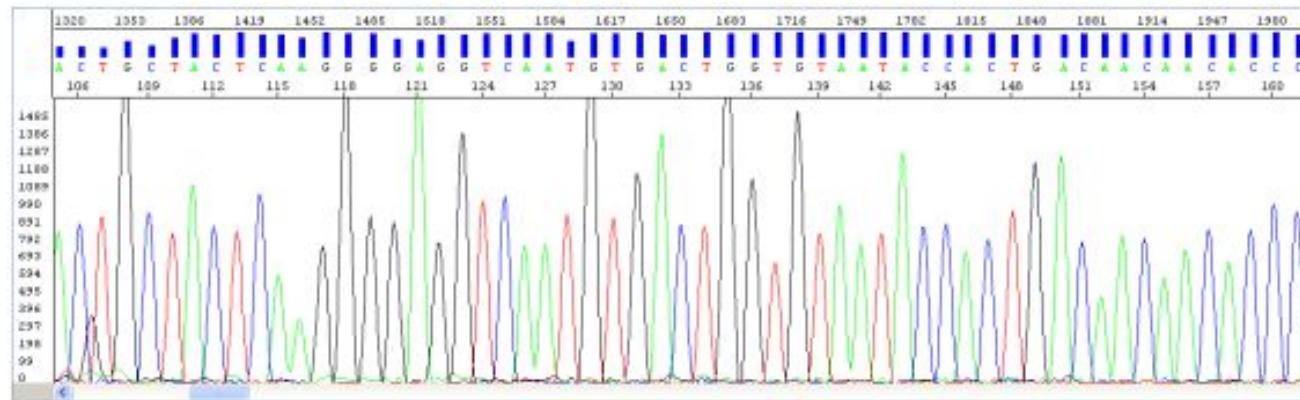


- Tiêu chuẩn vàng cho phát hiện trình tự lặp, CNV, SNP
- **Đơn giản và tối ưu chi phí: quy trình đơn giản**
- Trả kết quả nhanh trong ngày
- Nhiều loci có thể phân tích trong 1 lần chạy.
- STRs có thể khuếch đại và chính xác kích thước.

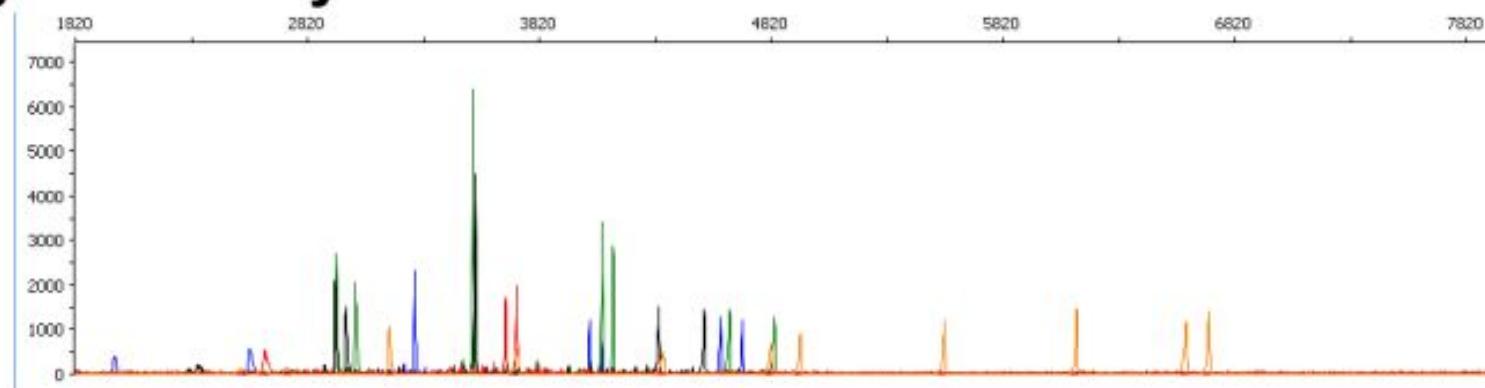
**Nhanh – đúng mục tiêu – chuyên biệt với trình tự phức tạp và mẫu khó**

# Capillary Electrophoresis Applications

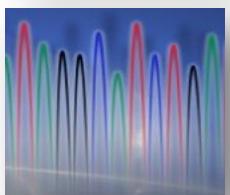
## 1. DNA Sequencing (Sanger Sequencing)



## 2. Fragment Analysis



# Quy trình GTT Sanger cơ bản



1. Tách chiết DNA/ RNA



2. PCR và tinh sạch sản phẩm PCR



3. PCR GTT và tinh sạch sản phẩm PCR GTT



4. Phân tách mẫu trên máy GTT



5. Phân tích kết quả

- Hệ thống phòng thí nghiệm PCR đầy đủ với từng phòng chức năng và thiết bị riêng
- Hóa chất và đồ tiêu hao tùy chọn

- Hệ thống giải trình tự Sanger tự động – 3500/ 3500xl
- Hóa chất, đồ tiêu hao và phần mềm phân tích chuyên dụng

# A traditional sequencing workflow

## *Sequencing Template Preparation and Cycle Sequencing*

### DNA Extraction



PCR

140 min



PCR Clean-Up

60 min



Cycle Sequencing

90 min



Purified PCR Product  
Ready to Sequence

Sample  
Purification

40 min



Capillary  
Electrophoresis

145 min

# Phân tích đoạn và HID



1. Tách chiết DNA/ RNA



2. PCR



2. Pha mẫu để chạy máy



3. Chạy máy và Phân tích kết quả



- Tách máy: máy tách tự động
- Tách tay: có giải pháp cho HID

**Thực tế hầu hết Khách hàng dùng giải pháp hãng khác**



- HID: chất chất PCR cho HID như Golobal filer, VF, YF...
- Sản: hóa chất PCR cho sản như: CarrierMax™ FMR1, SMN1/SMN2 kits, QF-PCR
- Plate 96/ strip 8 cho PCR

**Đối thủ bán rất phổ biến**



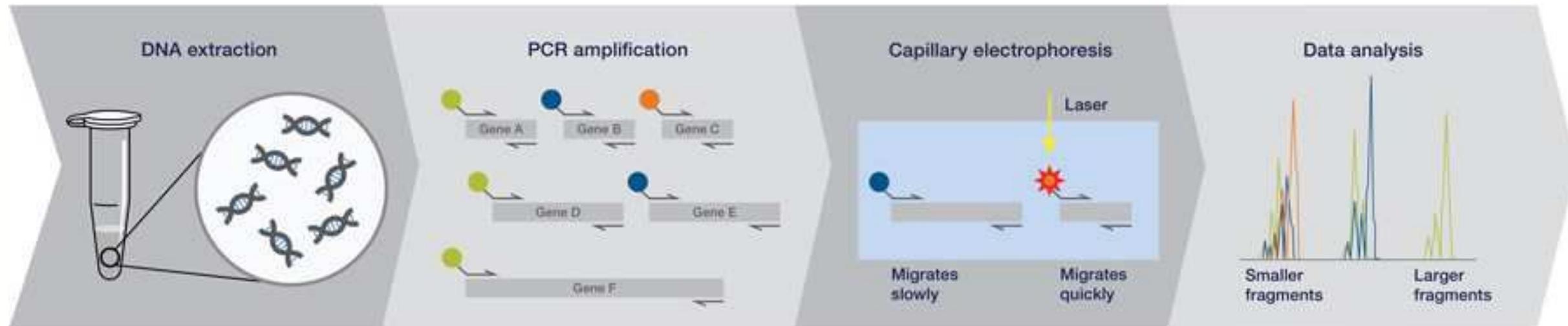
- Hi-Di; Plate Septa - 96 well; plate 96 well
- Hóa chất Genscan 600 Liz/rox....
- Plate 96/ strip 8 cho PCR

**Hầu hết phải mua của mình HiDi.**



- Mua hóa chất vật tư chạy máy của mình (bắt buộc)

# Fragment Analysis Workflow



# Ứng dụng CE trong chẩn đoán

Ứng dụng	Kĩ thuật							
	Giải trình tự			Phân tích đoạn				
Single-gene sequencing	Small-gene panel testing	NGS confirmation	MLPA	Microsatellite instability (MSI) testing	Repeat primed PCR	STR genotyping	SNP genotyping	
Điều trị Ung thư	X	X	X	X	X			X
Bệnh di truyền	X	X	X	X	X	X		X
Sức khỏe sinh sản		X	X	X		X		
Vi sinh/ phân biệt loài	X	X					X	
Chẩn đoán cây ghép		X						

# Ứng dụng của CE

- **Sức khỏe sinh sản và bệnh di truyền**

- CarrierMax SMA/FMR
- Sàng lọc người mang gen, phát hiện di truyền như: vô sinh nam, máu khó đông, ...
- Chẩn đoán trước sinh QF-PCR

- **Điều trị ung thư**

- Sàng lọc hội chứng Lynch và điều trị ung thư đại trực tràng.
- Giải trình tự các đột biến ung thư khác phục vụ điều trị và sàng lọc: BRCR1/2, EGFR, KRAS,...
- Xác nhận lại các đột biến sau NGS

- **Chimerism**

- **Chẩn đoán cây ghép: HLA type1**

- **Bệnh truyền nhiễm:**

- Giải trình tự tìm biến chủng SARS-CoV-2
- HIV-1 Genotyping Kit
- Giải trình tự vi sinh 16S: MicroSEQ Microbial Identification System
- Giải trình tự tìm đột biến kháng thuốc: Lao, HBV, HCV,...
- Định type HPV, HCV...

- **Xét nghiệm huyết thống**

- **Các nghiên cứu cần xác định trình tự khác**

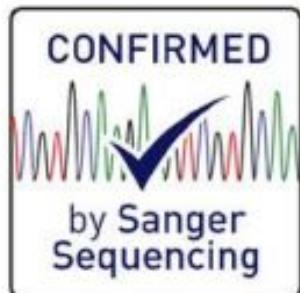
# Các ứng dụng giải trình tự trong bệnh viện

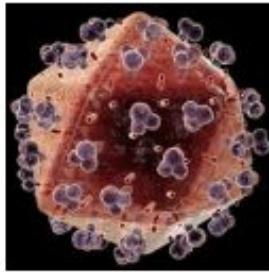
- Phát hiện các đột biến gene, chuyển gene, phát hiện các đột biến liên quan đến ung thư, bệnh di truyền, các con đường chuyển hóa, các đột biến kháng thuốc.....
- Xác định genotyping: ví dụ định type HBV, HPV, HIV...
- Giải trình tự là tiêu chuẩn vàng để đánh giá hiệu quả của các phương pháp sinh học phân tử khác : Realtime PCR, Elisa, lai phân tử, giải trình tự thế hệ mới....

# Sanger Sequencing – Applications



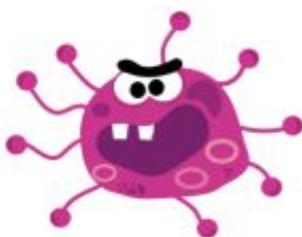
- 1. De novo sequencing**  
= sequencing a novel genome for the first time
  
- 2. Targeted DNA sequencing (= Resequencing)**
  - Mutation detection
  - Checking clone constructs
  - Comparative genomics
  - SNPs
  - Insertions
  - Deletions
  
- 3. Validation of Next Generation Sequencing data**



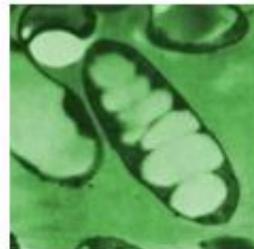


## 4. Human Leukocyte Antigen (HLA) sequencing

= *sequencing of locus of genes that encode for proteins on surface of cells responsible for regulation of human immune system*



## 5. Microbial and fungal sequencing



## 6. Mitochondrial DNA sequencing

- Disease research (diabetes, some cancers)
- Population genetics, biodiversity assessment
- Heteroplasmic mutations

# Fragment Analysis – Techniques & Applications

## 1. Microsatellite/Short Tandem Repeats (STR) Analysis

*Polymorphic DNA loci consisting of a repeated nucleotide sequence*

**Applications:** Linkage mapping, animal breeding, HID, pathogen subtyping

## 2. Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Genotyping

*A SNP marker consists of a single base pair that varies in the known DNA sequence → creates up to 4 alleles or variations of the marker*

## 3. Fingerprinting (Amplified Fragment Length Polymorphism)

*Uses restriction enzyme length polymorphism to create a ‘fingerprint’ of genomic DNA for differentiation between samples*

**Applications:** Microbial/animal/plant genome typing, creation of genetic maps

## 4. Relative Fluorescence Quantitation (RFQ)

*Compare peak height or area of different samples*

**Applications:** Loss of Heterozygosity (LOH) in tumour samples, Copy Number Variation (CNV), aneuploidy detection

# Thank You

