ATGCTGATCGCTAATGGCG

Princípios das metodologias utilizadas nas plataformas *Illumina* e *Ion Torrent*

Dra Patrícia Natália Silva

Curso de Introdução à análise bioinformática aplicada à genética

Introdução

 Estudos de GWAS tem sido amplamente utilizados para a descoberta de fatores de risco genéticos para doenças humanas

- Entretanto, este método investiga fatores de risco comuns na população
- Busca de um método mais abrangente de sequenciamento
 - Investigam todos os alelos que contribuem conferindo risco: Inclusive alelos com baixa frequência e de novo

Introdução

 Custo da técnica e tempo de bancada do sequenciamento Sanger - Surgimento dos NGS (sequenciamento de nova geração)

- Permitiu/Facilitou a análise de:
 - Ressequenciamento do genoma total
 - Sequenciamento de novo
 - Ressequenciamento de regiões alvo candidatas
 - Análises de Exoma
 - Entre outras

Etapas pré-sequenciamento

Construção de uma biblioteca

Fragmentação do DNA



Ligação de Adaptadores

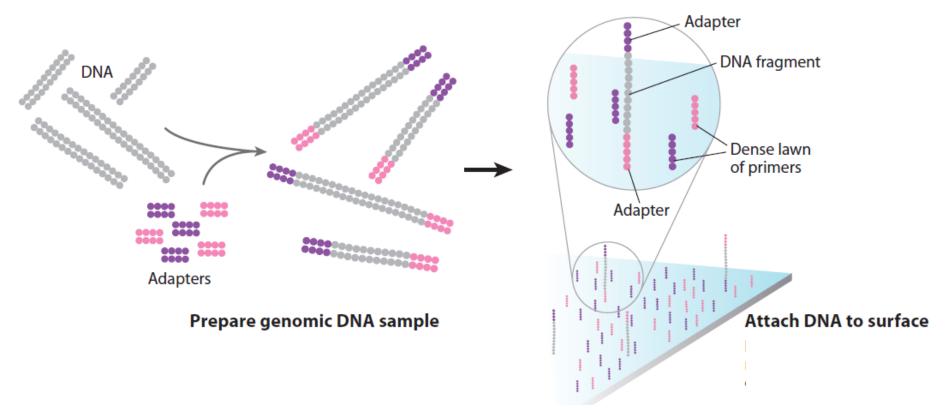


Amplificação das sequências

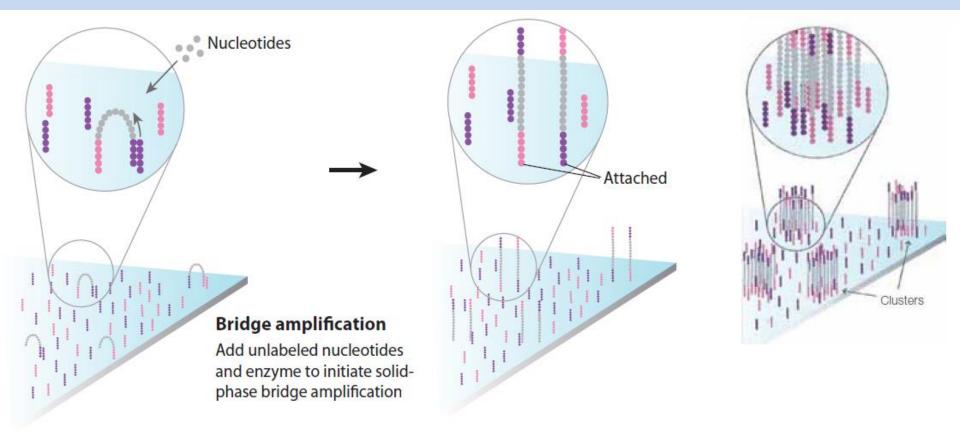
Illumina - Sequencing by synthesis

- Construção da biblioteca PCR em fase sólida
- Superfície de clonagem (flow cells) é dividida em oito linhas que podem ser utilizadas para o sequenciamento de até oito bibliotecas
- Adaptadores são fixados à superfície pela extremidade 5', deixando a extremidade 3' livre para iniciar a reação de sequenciamento
- Utilização de polimerase e nucleotídeos marcados para detecção da sequência durante a síntese de nova fita

Illumina - Sequencing by synthesis



- Sequências fragmentadas
- Ligação de adaptadores A e B
- Ligação das sequências na lâmina Oligonucleotídeos complementares aos adaptadores A e B

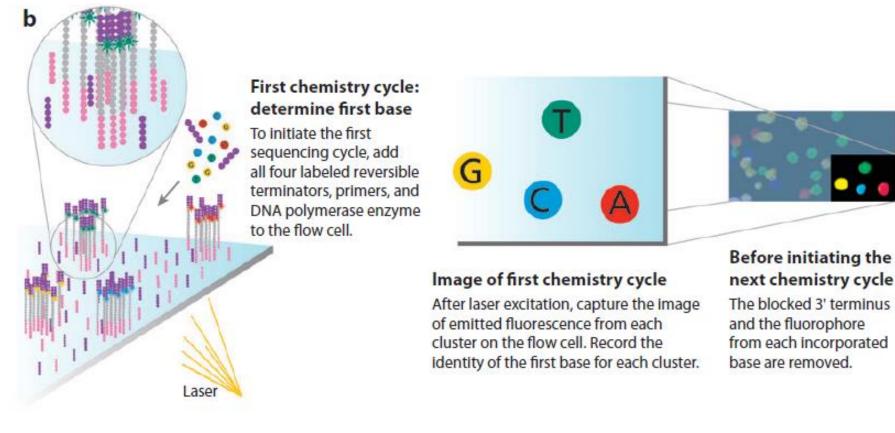


- Formação de pontes
- Nucleotídeos e reagentes que induzem a cópia de sequências
- Formação de *clusters*
- Cliva as duplas fitas e elimina a fita *reverse*
- Insere oligonucleotídeos e nucleotídeos marcados

next chemistry cycle

and the fluorophore

base are removed.



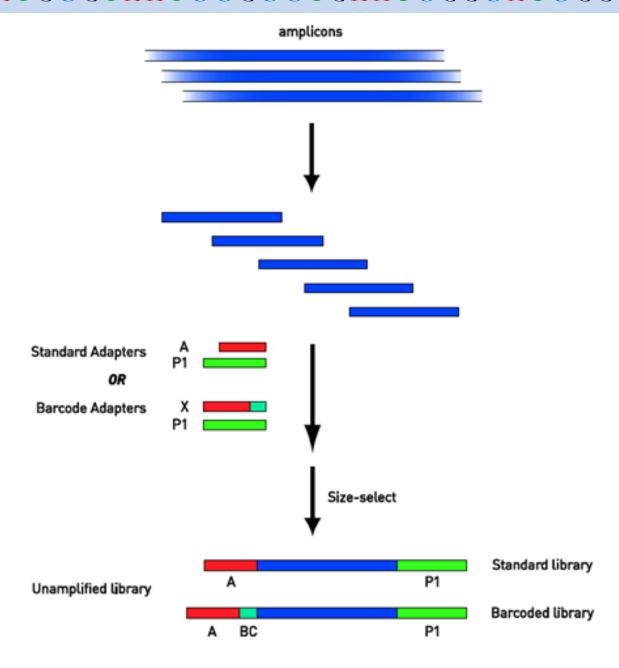


Sequence read over multiple chemistry cycles

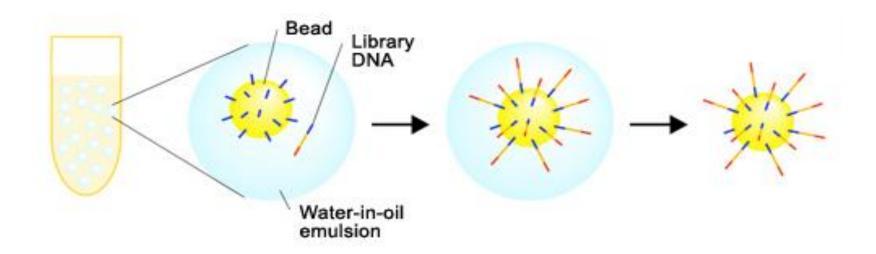
Repeat cycles of sequencing to determine the sequence of bases in a given fragment a single base at a time.

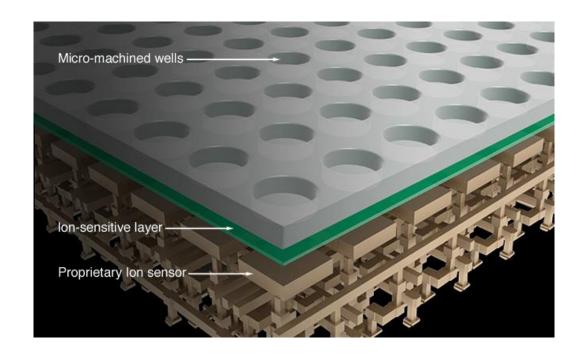
Ion Torrent

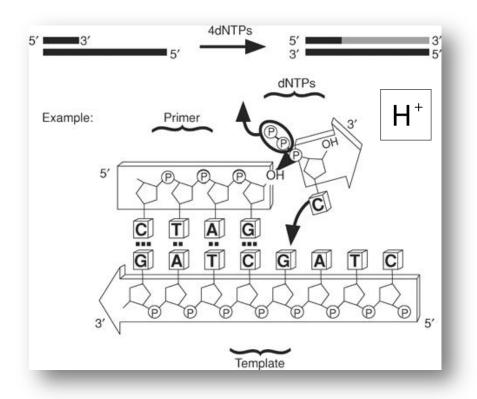
- Amplificação da biblioteca PCR emulsão
- Utilização de semicondutores Não utiliza detecção óptica nem fluorescência
- Detecção de íons de H⁺ liberados após a incorporação de nucleotídeos à sequência - Alteração de pH
- Liberação de um nucleotídeo por vez

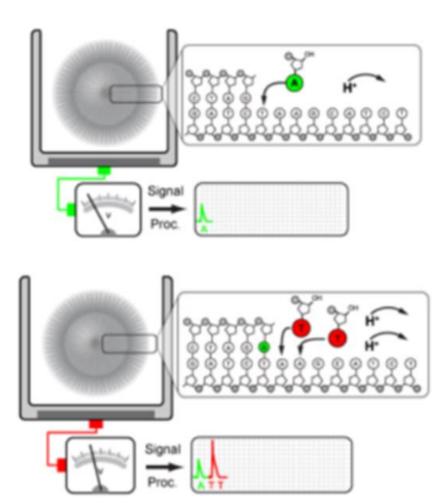


Oil & Water Phase **Emulsion** Aqueous phase Polyclonal micro-reactor Monoclonal micro-reactor (desired) Oil phase Non-clonal micro-reactor Mixing Multi-bead micro-reactor Library templates (same sample) Library templates (same sample) DNA polymerase DNA polymerase









Exoma

- Sequenciamento do exoma: Identificar variantes de regiões codificadoras de genes (éxons) que afetam a função de proteínas
- Métodos de captura para sequenciamento do exoma:
 - PCR
 - Captura baseada em solução
 - Hibridação em chip
 - Sonda de Inversão Molecular

Exoma

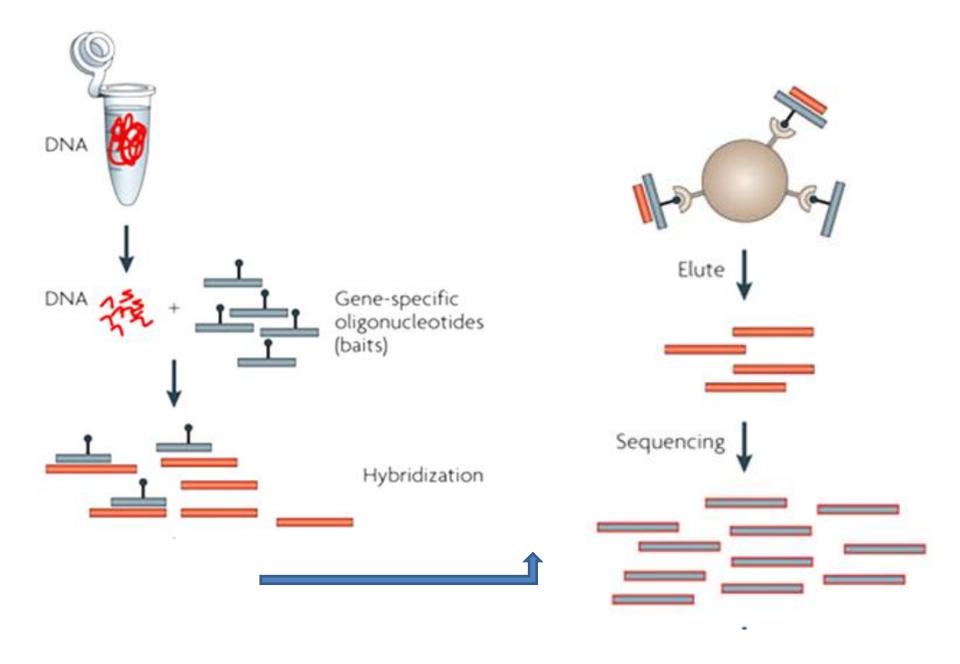
- Sequenciamento do exoma: Identificar variantes de regiões codificadoras de genes (éxons) que afetam a função de proteínas
- Métodos de captura para sequenciamento do exoma:
 - PCR
 - Captura baseada em solução
 - Hibridação em chip
 - Sonda de Inversão Molecular

PCR:

- Amplificação baseada em primers que flanqueiam a região de interesse
- Dificuldade: construção de reações multiplex

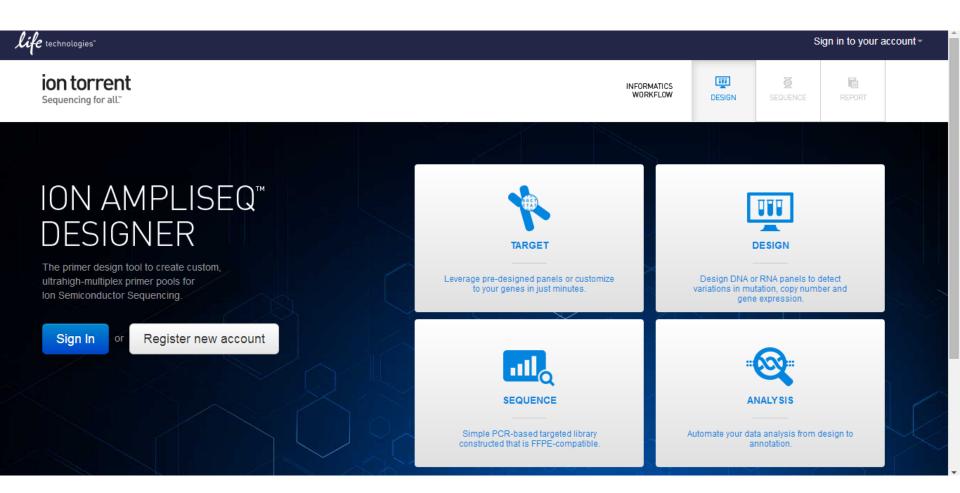
Captura em solução:

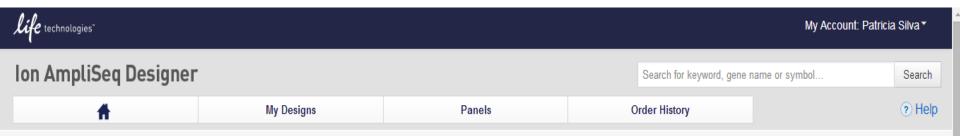
- Utiliza conjuntos de sondas (complementares a éxons de interesse) que se ligam a beads magnéticas
- Captura das beads, lavagem e obtenção de éxons
- Dificuldade: Utilização de muito DNA genômico

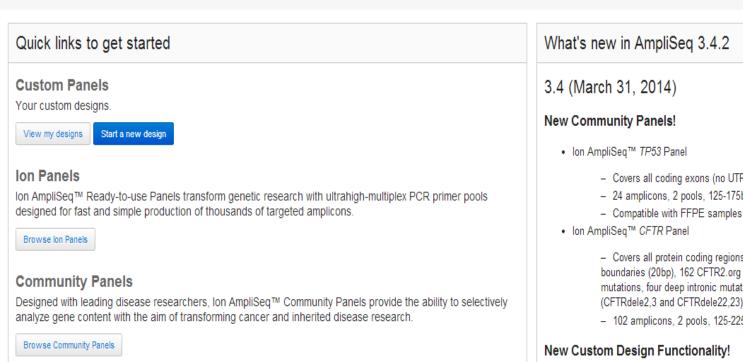


Ampliseq

 Ion AmpliSeq™ permite a construção de reações multiplex para a amplificação rápida de milhares de sequências alvo



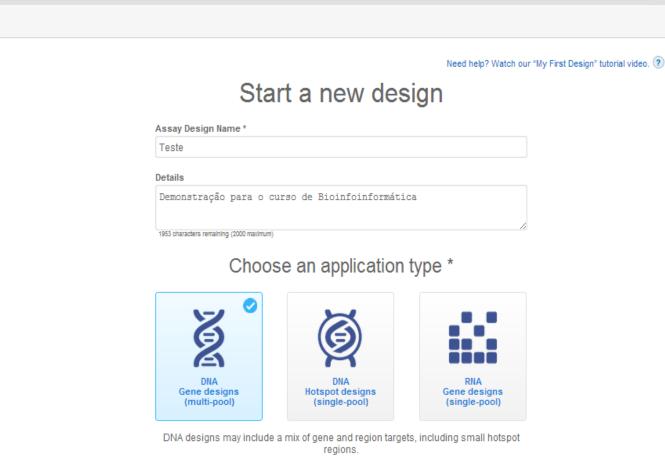


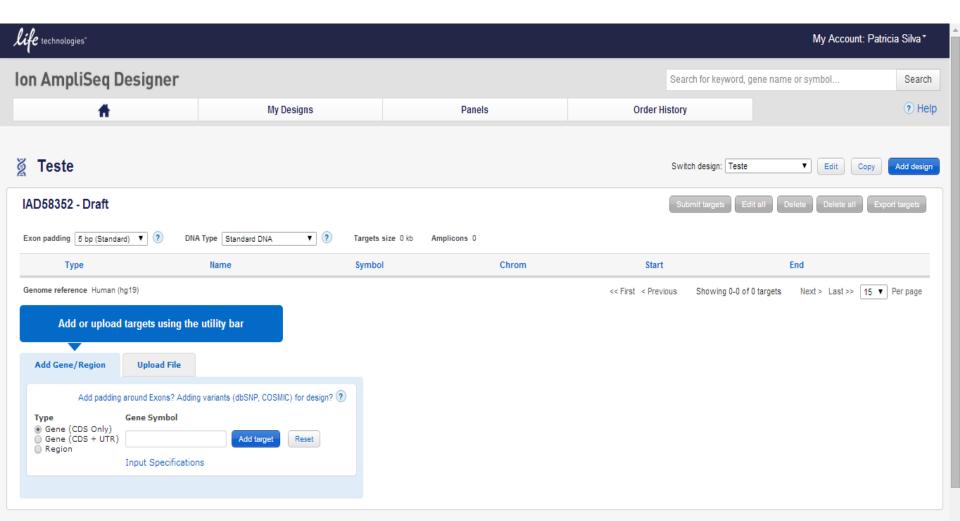


- Covers all coding exons (no UTRs)
- 24 amplicons, 2 pools, 125-175bp design
- Covers all protein coding regions including UTRs, intron/exon boundaries (20bp), 162 CFTR2.org mutations including 23 ACMG/ACOG mutations, four deep intronic mutations, and two large deletions (CFTRdele2,3 and CFTRdele22,23).
- 102 amplicons, 2 pools, 125-225bp design

· New hotspot design capability

Ion AmpliSeq Designer Search for keyword, gene name or symbol... My Designs Panels Order History





Terms & Conditions | Privacy Policy | Help | Regional Contact | FAQ | Release Notes

FOR RESEARCH LISE ONLY NOT INTENDED FOR ANY ANIMAL OR HUMAN THERAPEUTIC OR DIAGNOSTIC LISE

#	★ My Designs			Panels		Order History		? Help
▼ Teste Switch design: Teste ▼ Edit Teste ▼ Test								Y Edit Copy Add design
IAD58352 - Draft						Submit targets		
✓ Target saved successfully								
Exon padding 5 bp (Standard) ▼ ② DNA Type Standard DNA ▼ ② Targets size ~4.02 kb Amplicons ~19								
Пуре		Name	Symbo	I	Chrom	Start		End
Gene (CDS Only	y) ▼	DGCR2	DGCR2					
Gene (CDS Only) ▼	CDH10	CDH10					
Genome reference Human (hg19) << First < Previous Showing 1-2 of 2 targets Next > Last >> 15 ▼ Per page								
Add Gene/Region	Upload File							
Add padding around Exons? Adding variants (dbSNP, COSMIC) for design? ② Type Gene Symbol								
Gene (CDS Only) Gene (CDS + UTR) Region		Add target Reset						
	Input Specifications							
		inni Contact I 540 I Deleve						

Terms & Conditions | Privacy Policy | Help | Regional Contact | FAQ | Release Notes

FOR RESEARCH USE ONLY NOT INTENDED FOR ANY ANIMAL OR HUMAN THERAPEUTIC OR DIAGNOSTIC US

