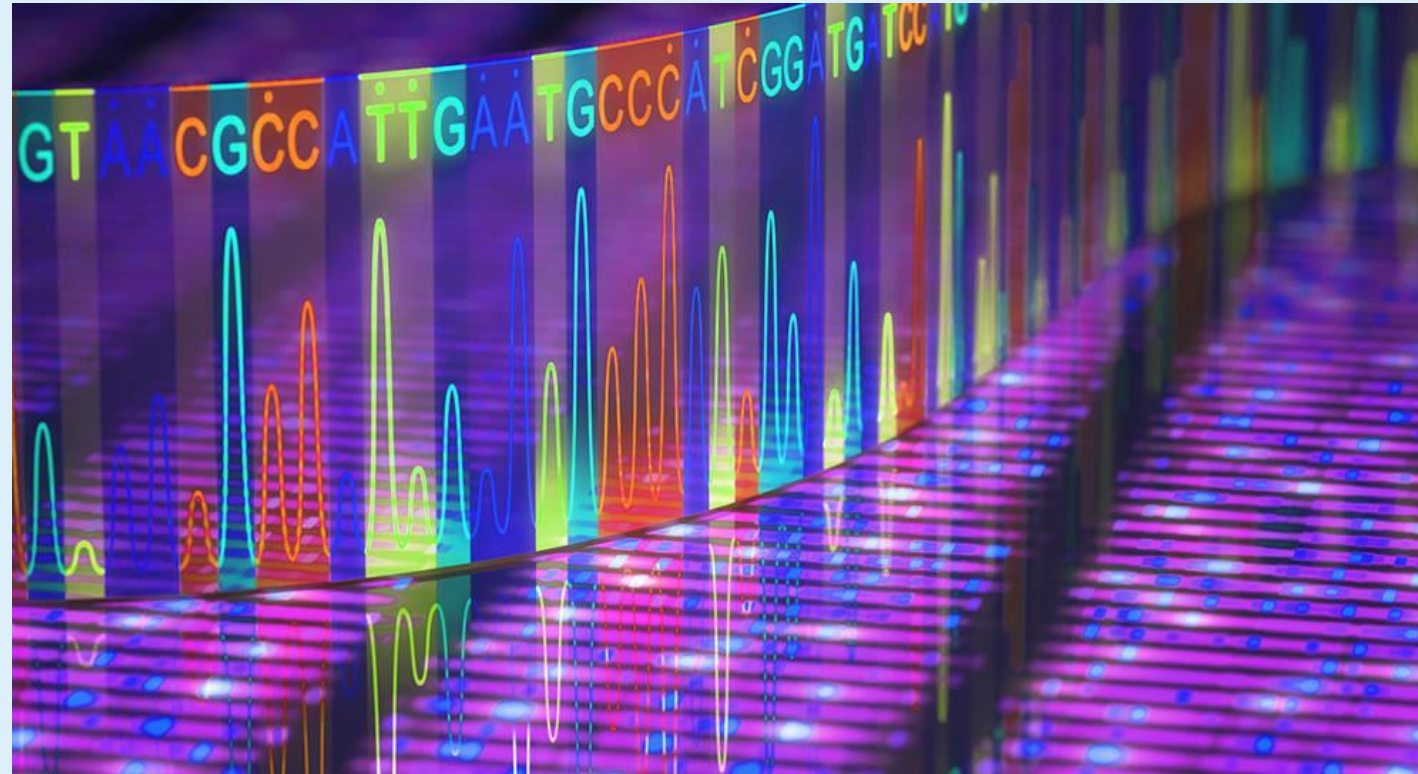


Вступ до секвенування нового покоління (Next Generation Sequencing, NGS)

Анна Яручик

Експерт Бюро ВООЗ в Україні



План:

1. Основні терміни.
2. Сфери застосування секвенування NGS.
3. Відмінності секвенування від ПЛР-діагностики.
4. Історія розвитку технологій секвенування.
5. Принцип методу секвенування за Сенгером
6. Секвенування нового покоління та етапи його робочого процесу.



Основні терміни

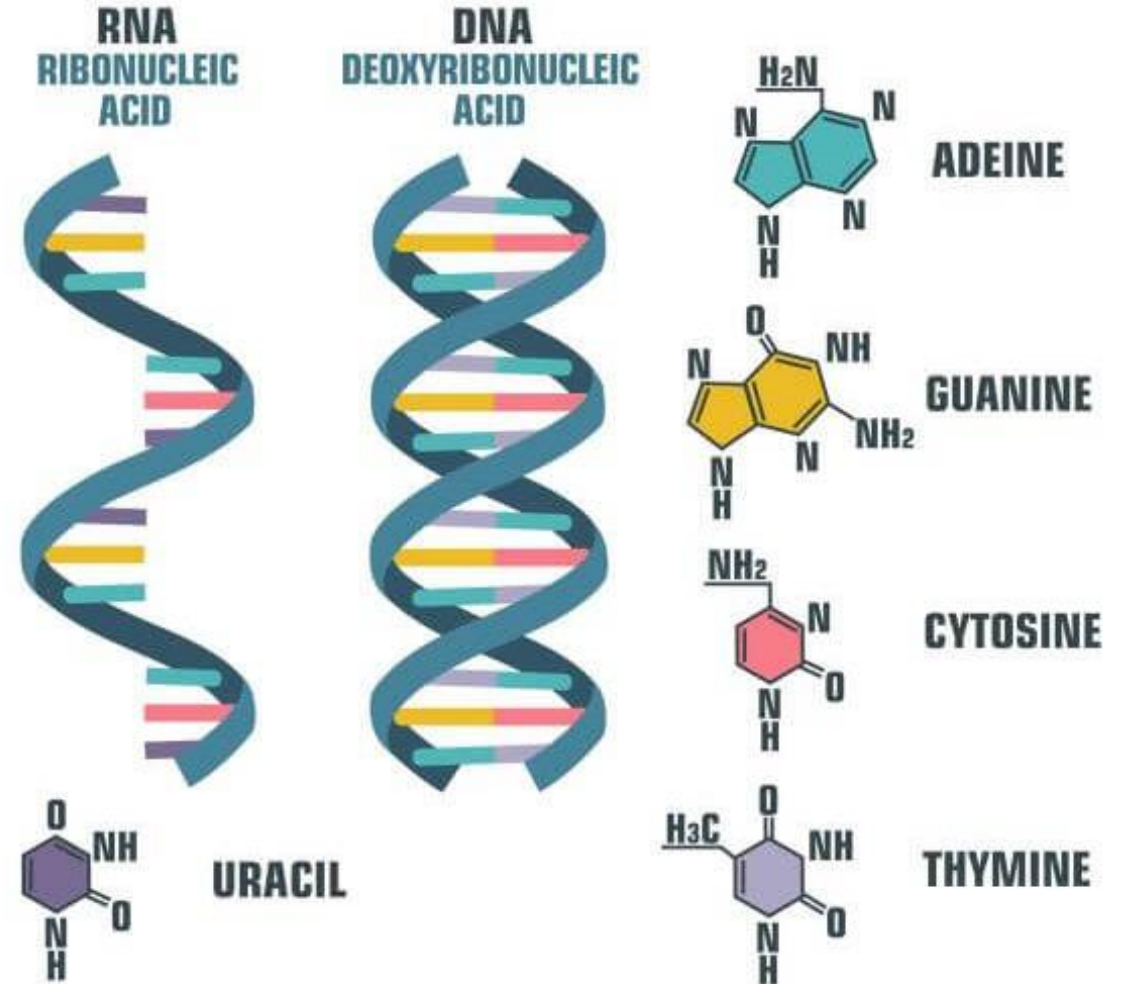
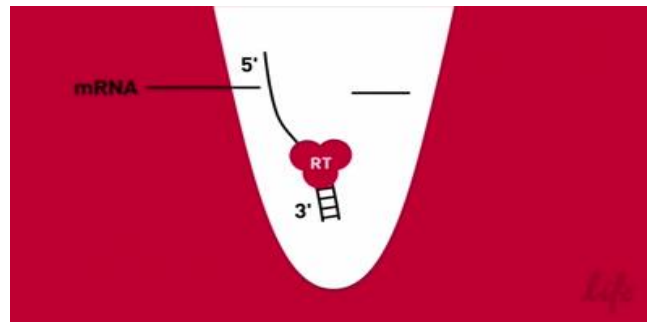
Геном- повний набір генетичної інформації одного організму або виду

Нуклеїнові кислоти:

ДНК- це дволанцюгова молекула, яка складається з 4х типів нуклеотидів (A, G, C, T).

РНК - одноланцюгова молекула, яка складається з 4х типів нуклеотидів (A, G, C, U).

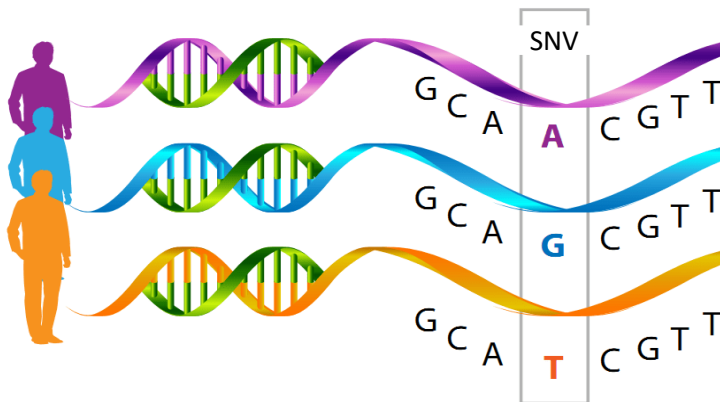
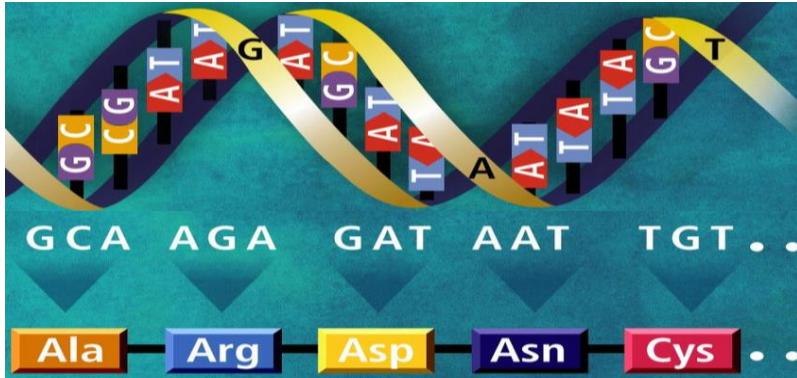
Під час зворотної транскрипції з РНК матриці утворюється комплементарна ДНК (кДНК):



Універсальний генетичний код

Триплет – це послідовність з трьох нуклеотидів, що кодує конкретну амінокислоту в білку.

Варіант (мутація, SNV) - це відмінність в генетичній послідовності ДНК в порівнянні зі стандартною або референсною послідовністю.



		2й нуклеотид			
		U	C	A	G
1й нуклеотид	U	UUU } Phe UUC } UUA } Leu UUG }	UCU } UCC } Ser UCA } UCG }	UAU } Tyr UAC } UAA } Stop UAG }	UGU } Cys UGC } UGA } Stop UGG } Trp
	C	CUU } CUC } Leu CUA } CUG }	CCU } CCC } Pro CCA } CCG }	CAU } His CAC } CAA } Gln CAG }	CGU } CGC } Arg CGA } CGG }
	A	AUU } Ile AUC } AUA } Met AUG }	ACU } ACC } Thr ACA } ACG }	AAU } Asn AAC } AAA } Lys AAG }	AGU } Ser AGC } AGA } Arg AGG }
	G	GUU } GUC } Val GUA } GUG }	GCU } GCC } Ala GCA } GCG }	GAU } Asp GAC } GAA } Glu GAG }	GGU } GGC } Gly GGA } GGG }

Основні терміни

Секвенування ДНК- це встановлення послідовності нуклеотидів в молекулі ДНК

Секвенування нового покоління (Next Generation Sequencing, NGS, масивне паралельне секвенування) - це високопродуктивна технологія секвенування нуклеїнових кислот, яка дозволяє швидко та ефективно визначити послідовність багатьох молекул ДНК/РНК одночасно в одному об'ємі біохімічної реакції.



Сфери застосування секвенування NGS:

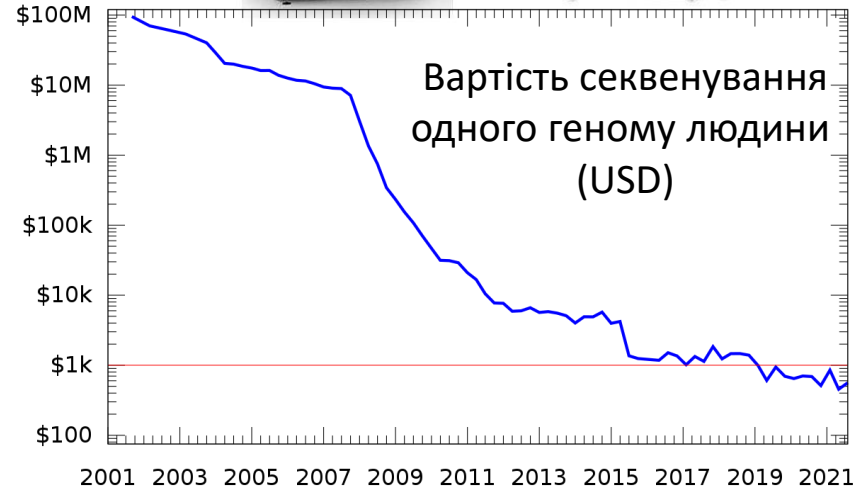
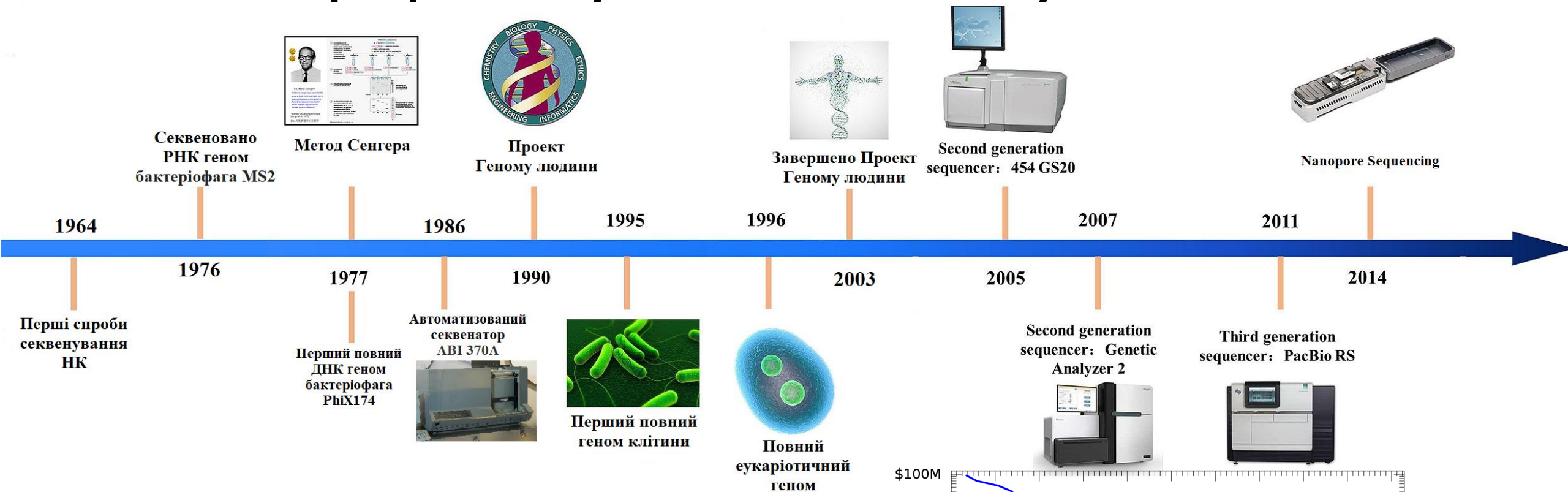
- Онкологічні дослідження та діагностика раку
- Діагностика інфекційних хвороб, типування бактерій та вірусів, дослідження мікробіомів, визначення антимікробної резистентності
- Діагностика спадкових захворювань
- Передімплантаційний та пренатальний скринінг в репродуктології
- Ідентифікація особи в криміналістиці
- Метагеномні дослідження
- Агрогеноміка
- Епігенетичні, еволюційні та багато інших досліджень...



Відмінності секвенування від ПЛР-діагностики:

ПЛР -діагностика	Секвенування нового покоління
Висока чутливість	Висока чутливість
Детектує лише відомі послідовності, задані праймерами	Не вимагає знання цільової послідовності, що дозволяє виявляти нові варіанти
Ефективна для малої кількості цілей (≤ 20 цілей) Можна досліджувати лише обмежений набір варіантів	Один експеримент NGS може ідентифікувати варіанти в тисячах цільових регіонів з високою роздільною здатністю для кожного нуклеотида
Детектує короткі послідовності	Визначає послідовності цілих генів та геномів
Час виконання займає кілька години	Час виконання займає кілька днів
Відносно дешевий та доступний метод	Вимагає значно більше зусиль та ресурсів

Історія розвитку технологій секвенування



Принцип методу секвенування за Сенгером

- ДНК ампліфікується

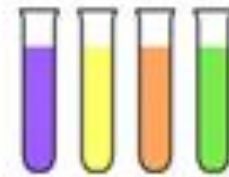
- Реакційна суміш: ДНК, праймери, полімераза, нормальні нуклеотиди, модифіковані дидезоксинуклеотиди (термінатори)

- Мічені ddNTP (термінатори) випадковим чином вбудовуються в комплементарний ланцюг ДНК і відбувається термінація синтезу ланцюга

- Терміновані фрагменти потім можуть бути розділені за розміром гель-електрофорезом чи капілярним електрофорезом залежно від методу детекції

- під впливом електричного струму короткі фрагменти рухаються швидше, ніж довгі фрагменти

4 реакційні суміші



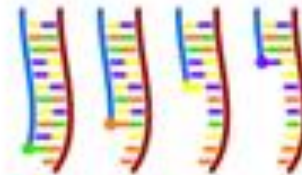
Денатурована ДНК



Приєднання праймера



Синтез ланцюга



Одноланцюгові фрагменти ДНК



Розділення фрагментів в гелі



Принцип методу секвенування за Сенгером

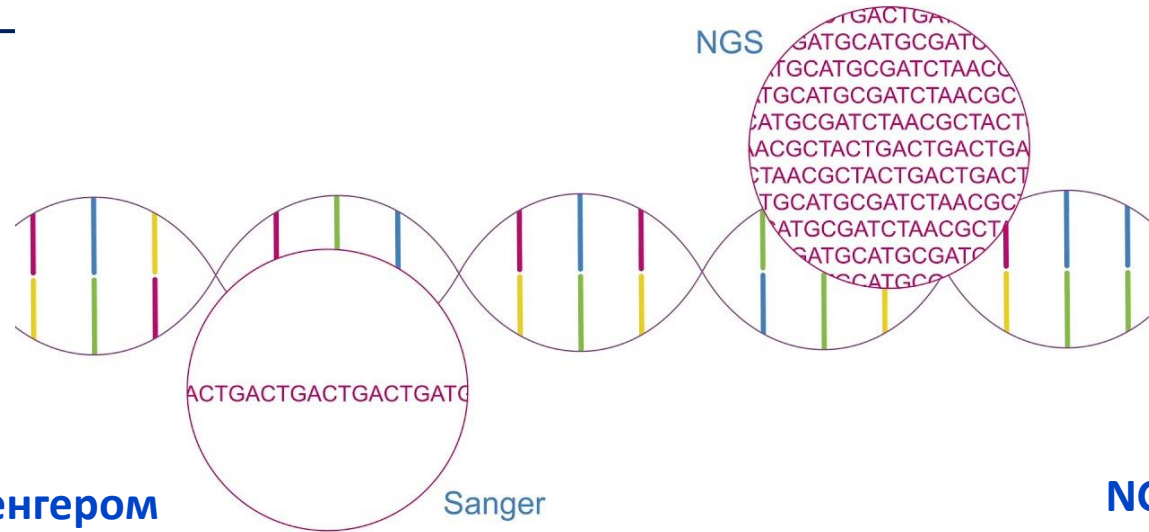


Відео:

<https://www.youtube.com/watch?v=wdS3j0TgbjM>



European Region



Секвенування за Сенгером

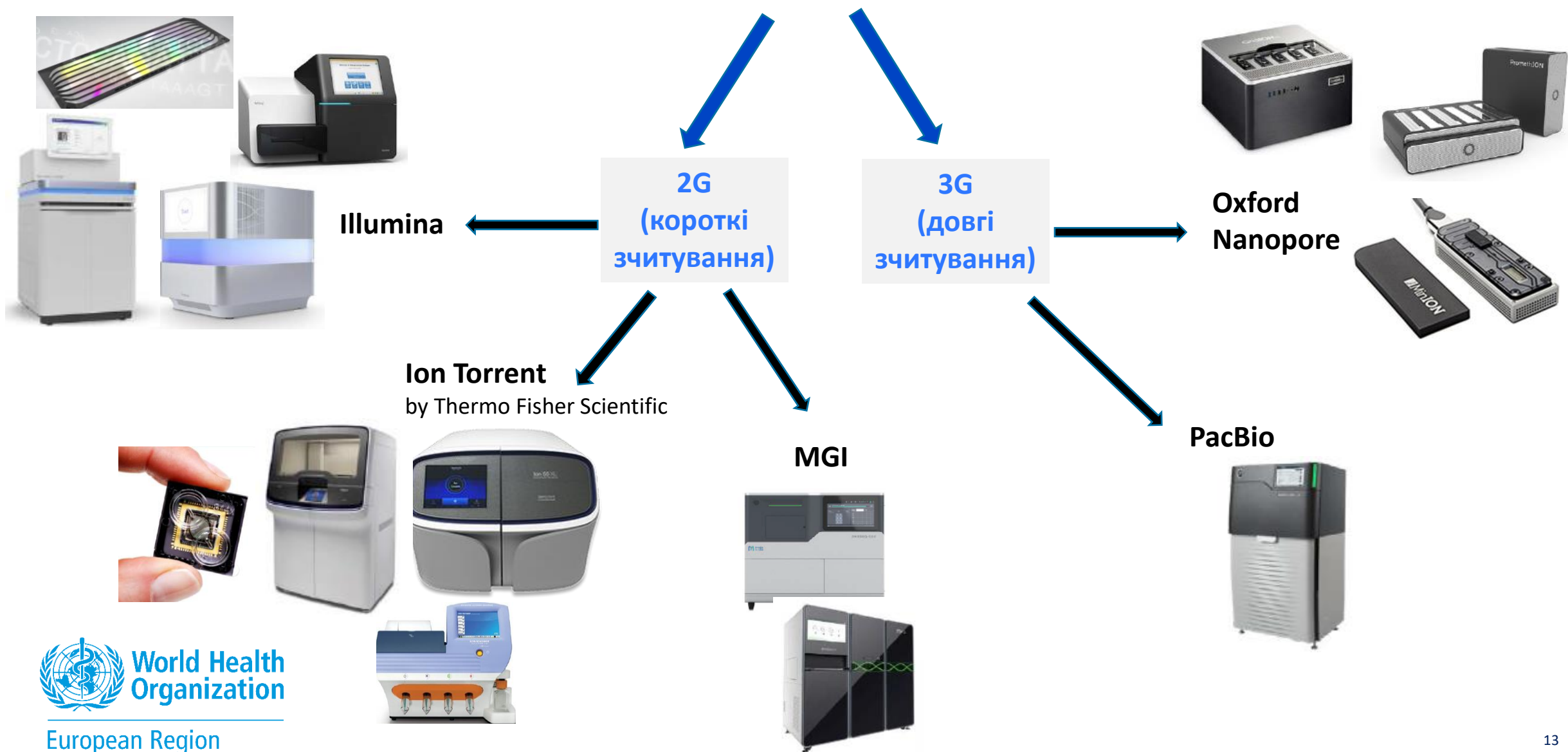
Sanger

NGS

- Швидке, економічно ефективне секвенування для невеликої кількості цілей (1–20 цілей)
- Секвенування одного зразка за реакцією
- Низька масштабованість
- Нижча чутливість (межа виявлення ~15–20%) – обмеження у виявленні низькочастотних варіантів
- Простий аналіз даних
- Підтвердження результатів NGS

- Більше даних, отриманих з такою ж кількістю вхідної ДНК, можливість секвенувати від сотень до тисяч генів одночасно, повногеномне секвенування
- Вища пропускна здатність великих обсягів зразків
- Висока масштабованість
- Вища глибина секвенування забезпечує вищу чутливість (до 1%) - виявлення низькочастотних варіантів

Платформи NGS



Терміни:

- **Зчитування (Read):** послідовність одного ДНК-фрагмента
- **Бібліотека (Library):** колекція ДНК-фрагментів з приєднаними адаптерами, підготовлена до секвенування
- **Адаптери:** олігонуклеотиди з відомими послідовностями, які лігуються з ДНК-фрагментами для зв'язування їх з матрицею в інструменті NGS.
- **Лігування:** це з'єднання двох фрагментів нуклеїнової кислоти ферментом лігазою.
- **Індекс (баркод):** коротка послідовність олігонуклеотидів, прикріплених до зразка для його ідентифікації при змішуванні з іншими зразками. Сам індекс також секвенується, таким чином діючи як «штрих-код» для ідентифікації зразка.
- **Прогін (run)** – окремий запуск секвенатора на заданих параметрах, в якому севенується один пул зразків.

Основні етапи робочого процесу NGS

1. Екстракція ДНК/РНК зі зразків, оцінка кількості та якості.
* Зворотня транскрипція для РНК

2. Підготовка бібліотеки

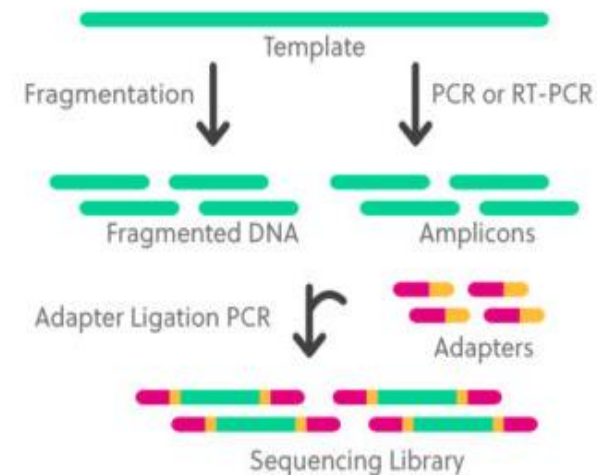
3. Секвенування

4. Аналіз даних

STEP 1: Extraction



STEP 2: Library Prep



STEP 3: Sequencing



STEP 4: Analysis

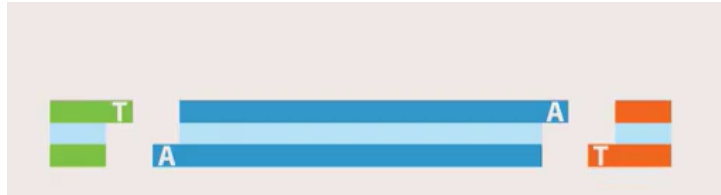


Основні етапи робочого процесу NGS

Фрагментація ДНК



Лігування з адаптерами



Клональна ампліфікація

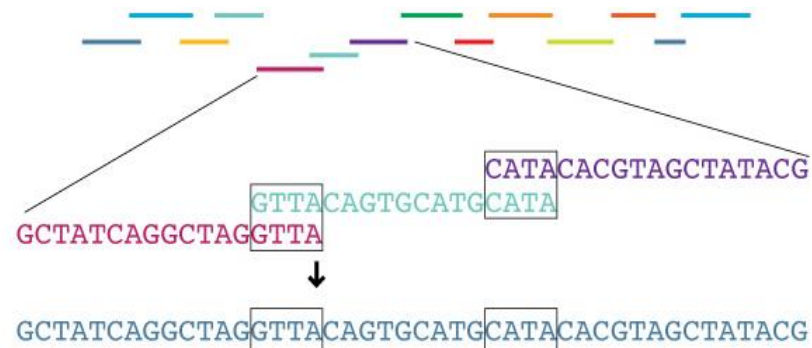
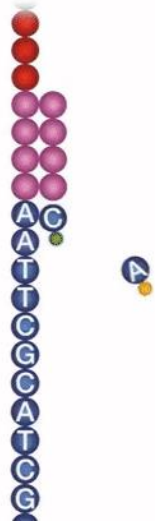
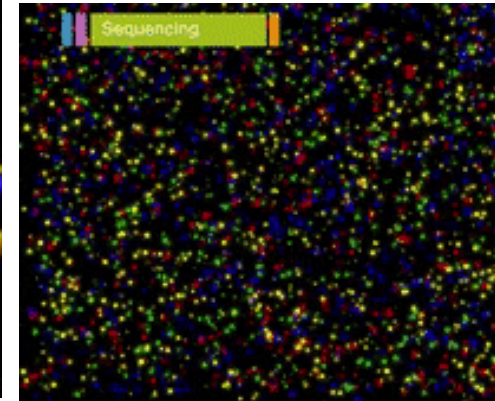
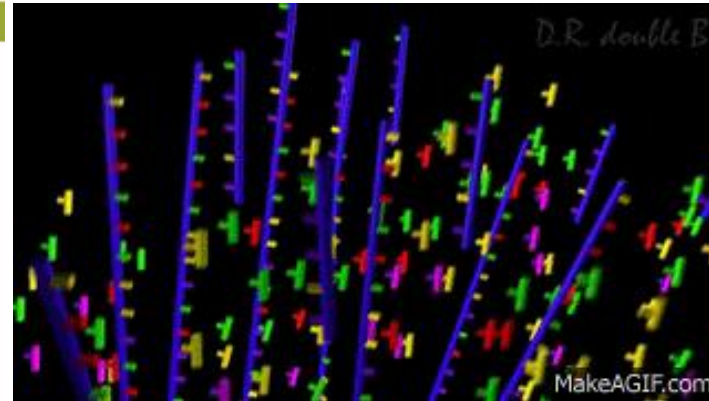


Підготовка бібліотеки

Секвенування

Аналіз даних

Sequencing



Дякую за увагу!

Анна Яручик

Експерт Бюро ВООЗ в Україні

iaruchyka@who.int



European Region

