

ADVANCED SEQUENCING TECHNOLOGIES

Journal Club 24.11.2004

Miks sekveneerida?

- Evolutsioon ja ökoloogia
globaalne biomass sisaldab 10^{38} nukleotiidi,
praeguseks sekveneeritud 10^{11} nukleotiidi
 - liikide kirjeldamine Sargasso meres
 - ökosüsteemide dünaamika
- Biomeditsiin
 - mutatsioonid kasvajakudedes
 - immuunsüsteemi varieeruvuse uurimine
 - DNA computing (1g DNA = 100 000 000 Tbytes information)
- Personal Genome: Iga inimese isikliku genoomi järjestuse määramine hinnaga \$1000 inimese kohta
 - farmakogeneetika
 - haiguste ja muude omaduste päriliku komponendi selgitamine

Sekveneerimise maksumus

Inimese genoomi projekt maksis \$3 000 000 000

Põhiosa sekveneerimisest tehti ca \$300 000 000 eest

Praegu maksaks ühe inimese genoomi uuesti sekveneerimine
ca \$10 000 000

Kas \$1000 / genoom on reaalne?

Nõuded tehnoloogiale

Kas \$1000 / genoom on reaalne?

- ühe nukleotiidi sekveneerimise hind
- vigade arv ühe nukleotiidi kohta
- korruga loetud nukleotiidide arv
- läbilaskevõime

Vigade arvust sõltub mitu korda peame sama kohta üle sekveneerima, et saada etteantud järjestuse kvaliteet.

99.7% raw read, 99.999% 3xcoverage

Kui need on juhuslikust kohast valitud lugemised, on vaja 7x coverage, et saavutada katvus >95% - ehk tegelikult 40 Gbp sekveneerimist diploidses inimese genoomis

Nõuded tehnoloogiale

Kas \$1000 / genoom on reaalne?

- ühe nukleotiidi sekveneerimise hind
- vigade arv ühe nukleotiidi kohta
- korruga loetud nukleotiidide arv
- läbilaskevõime

Juhuslikul sekveneerimisel oluline ka ühe lugemise pikkus.

Kui kõik sekventsidsid on 20bp pikkused, ei ole neid võimalik lokaliseerida, ainult 73% genoomist on unikaalne 20bp ulatuses.

Hinnanguliselt vajalikud vähemalt 60bp pikkused lugemised, et paigutada unikaalselt >95% inimese genoomist.

Nõuded tehnoloogiale

Kas \$1000 / genoom on reaalne?

- ühe nukleotiidi sekveneerimise hind
- vigade arv ühe nukleotiidi kohta
- korruga loetud nukleotiidide arv
- läbilaskevõime

Läbilaskevõime võiks olla selline, et 3 000 000 000 nukleotiidi saaks sekveneeritud inimese eluea jooksul (35 000 bp/s vajalik ööpäevaga sekveneerimiseks)

Praegune läbilaskevõime 24 bp/sec*instrument

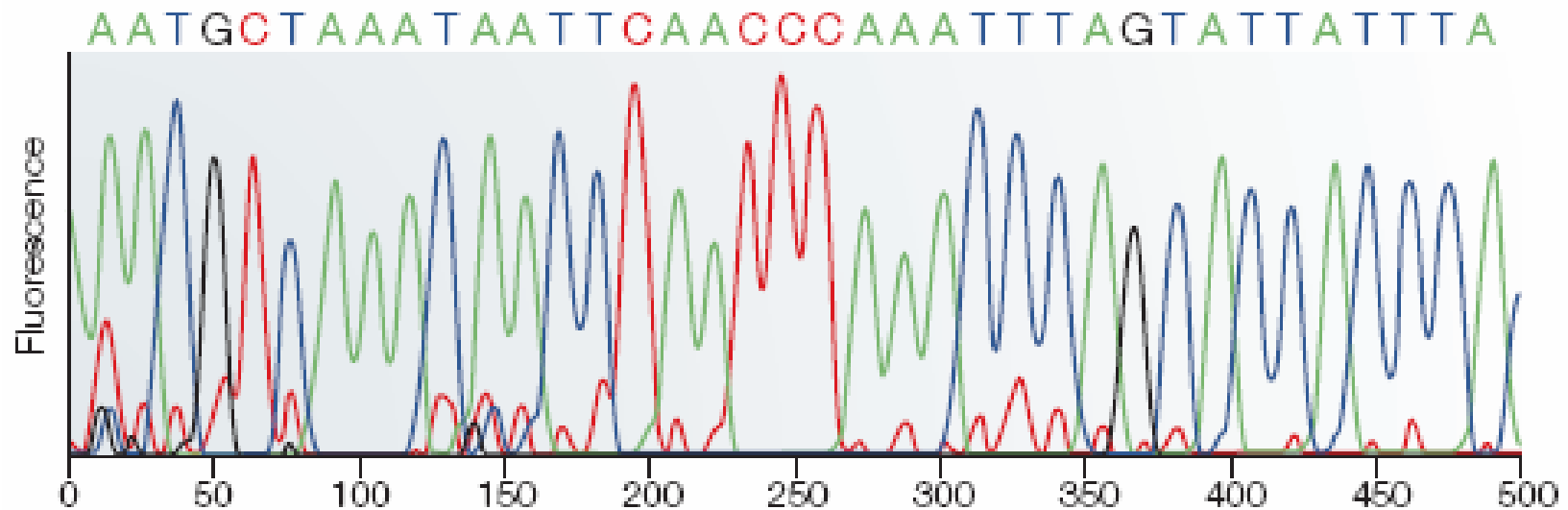
=> vajalik 95 aastat või 1000 instrumenti sekveneerimiseks ühe inimese kohta.

Kuidas sekveneerida?

- **Traditsioonilise Sangeri meetodi edasiarendused**
- **Hübriidiseerumisel põhinev sekveneerimine (SBH)**
- **Tsükliline sekveneerimine**
- **1 molekuli sekveneerimine**
- **Muud meetodid**

Kuidas sekveneerida?

- **Traditsioonilise Sangeri meetodi edasiarendused**



Current technology is approaching US \$1 per 1,000-bp raw sequencing read and a throughput of ~24 bases per instrument second.

Typically, 99.99% accuracy can be achieved with as few as three raw reads covering a given nucleotide.

Kuidas sekveneerida?

- **Traditsioonilise Sangeri meetodi edasiarendused**

Kas sobib ULCS tehnoloogiaks?

Pluss:

+ Töökindel ja testitud meetod

Miinus:

- Elektroforeesi vajalikkuse tõttu on aeglane

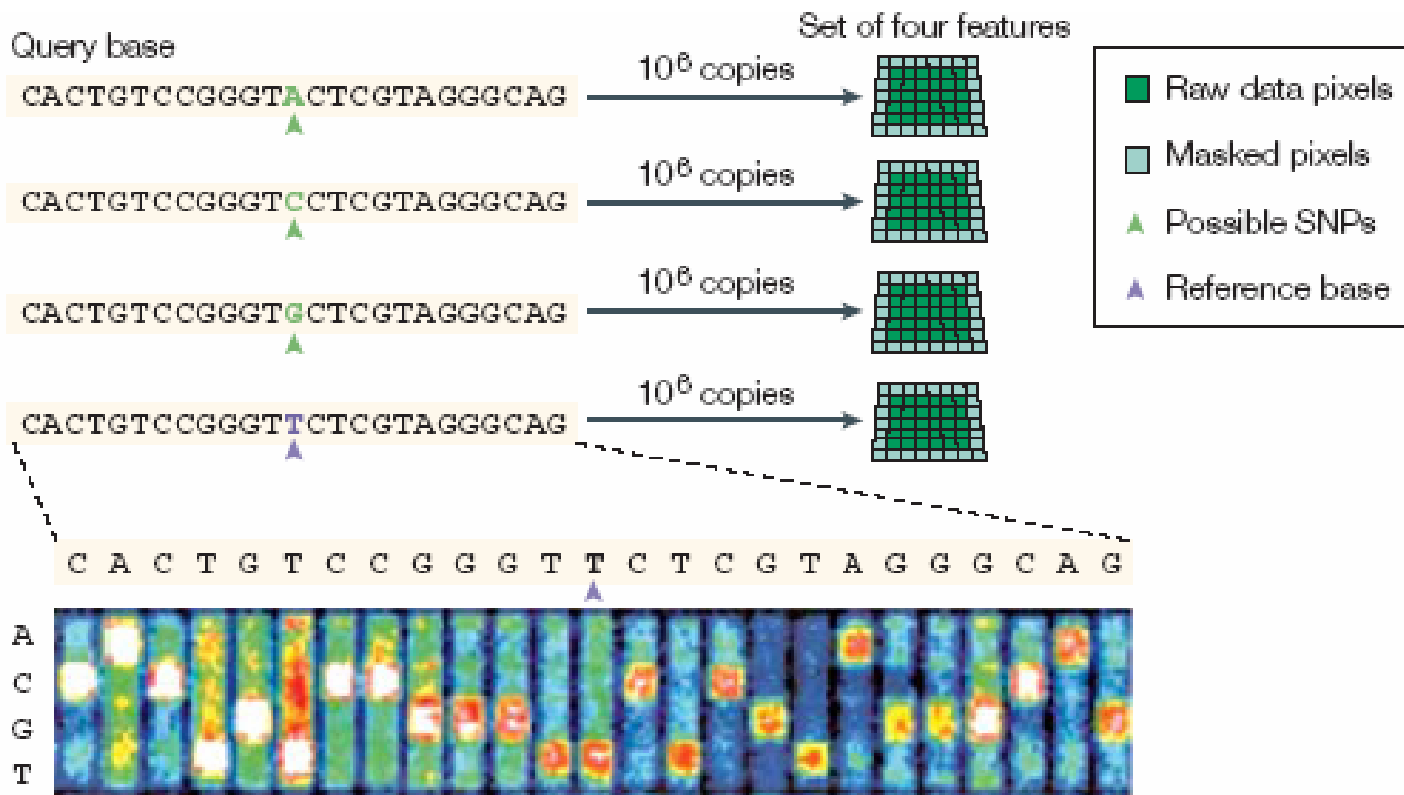
On potentsiaali hinna vähendamiseks ca 100 korda,
kuid mitte oluliselt rohkem

Kuidas sekveneerida?

- Hübridiseerumisel põhinev resekveneerimine**

Affymetrix ja Perlegen

neli 25 bp oligot iga nukleotiidi kohta



Kuidas sekveneerida?

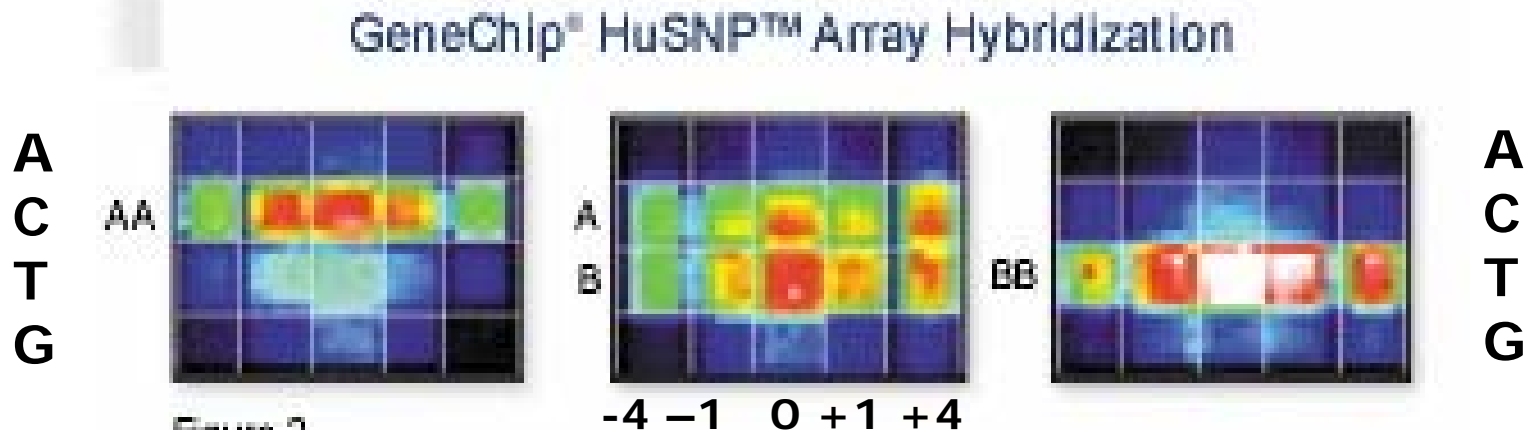
Hübridiseerumisel põhinev resekveneerimine

Affymetrix:

HuSNP Array

HIV chip

Iga SNP analüüsimiseks 20 erinevat proovi

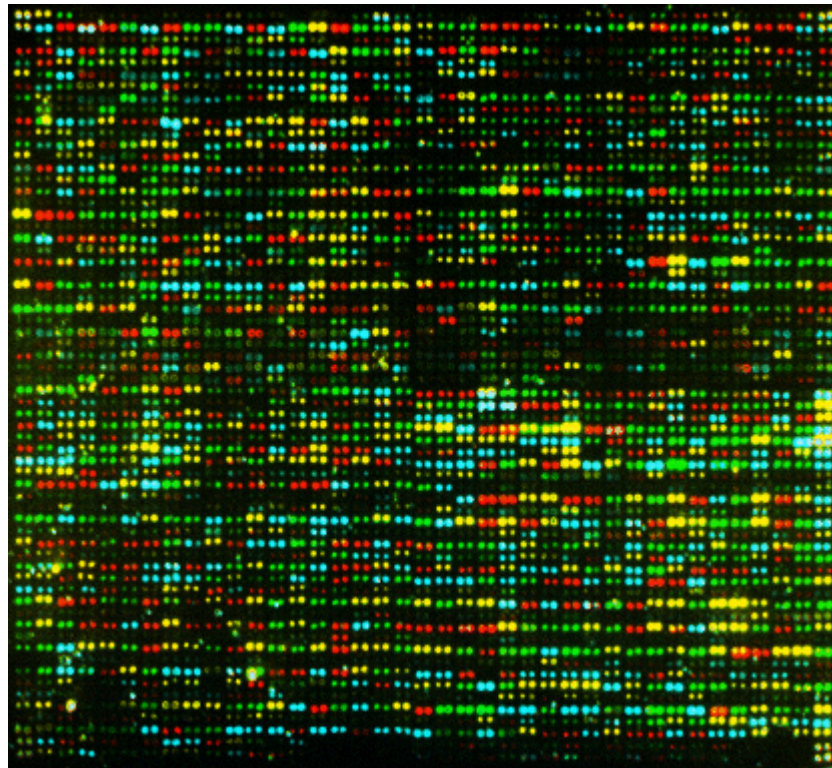


Resulting hybridization signals for one SNP marker for three individuals with respective genotypes AA, AB and BB.

Kuidas sekveneerida?

- **Hübridiseerumisel ja ensümaatilisel reaktsioonil põhinev resekveneerimine**

Asper Biotech
p53 kiip



Exons 2 to 9 of the tumor suppressor gene p53 resequenced in APEX assay

Kuidas sekveneerida?

- **Hübriidiseerumisel põhinev resekveneerimine**

Kas sobib ULCS tehnoloogiaks?

Pluss:

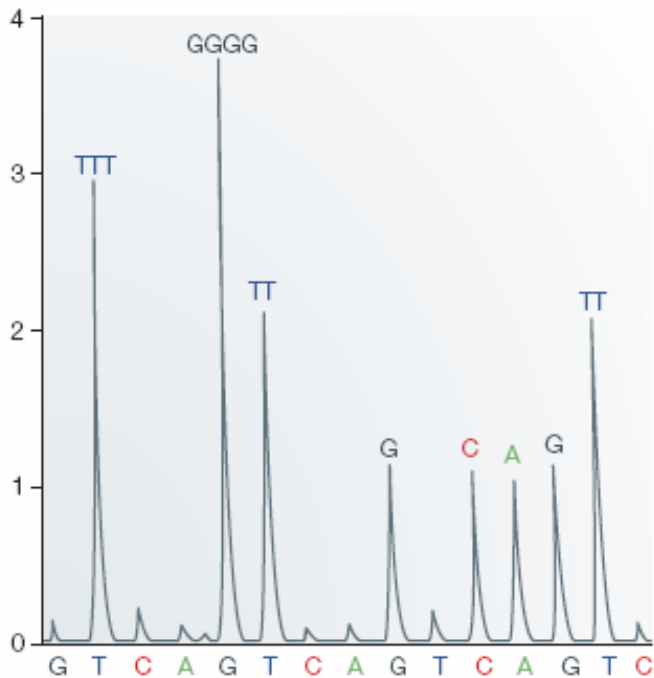
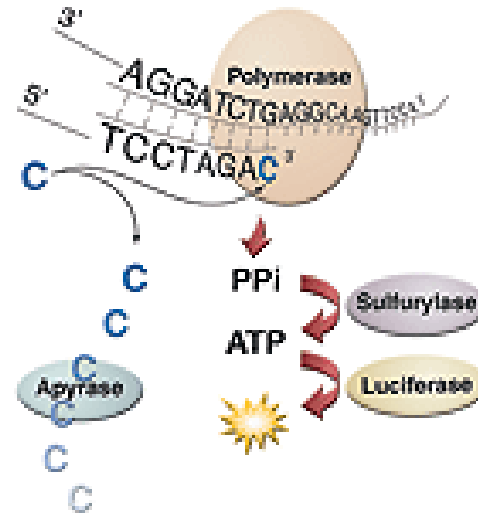
- + Kõrge paralleelsus
- + Kiire skaneerimine

Miinus:

- Vajalik genoomi osade unikaalne amplifitseerimine
- Ühe lugemise (read) pikkus 25 bp – sobib ainult teadaolevate järjestuste RE-sekveneerimiseks
- Korduvad alad raskendavad spetsiifilise signaali saamist
>50% genoomi piirkondades
- Madal täpsus (3% valepositiivseid signaale)

Kuidas sekveneerida?

- **Tsükliline sekveneerimine**
Pyrosequencing



Esialgsed meetodid võimaldasid lugeda vaid 1 reaktsiooni korraga ca 70 bp ulatuses.

Praegu on olemas meetodika >100 000 pikoliitrisel mahus oleva reaktsiooni samaaegseks lugemiseks. Hind ja täpsus pole teada.

Kuidas sekveneerida?

- **Tsükliline sekveneerimine**

Fluorescent in situ sequencing (FISSEQ)

Kuna signaali tugevust raskem kvantitatiivselt hinnata on vajalik spetsiaalsete nukleotiidide olemasolu:

reversible terminators – korraga lülitub vaid üks nukleotiid (terminaator), kuid järgmise tsükli algul muudetakse DNAsse lülitunud terminaator keemiliselt või ensümaatiliselt tavaliseks nukleotiididiks, mille külge saab liita järgmise nukleotiidi.

Sellisel juhul ei teki homopolümeeride lugemise probleemi ja kui kasutada 4 erinevat värvi saaks protsessi kiirendada.

- Tsükliline sekveneerimine**

Fluorescent in situ sequencing (FISSEQ)

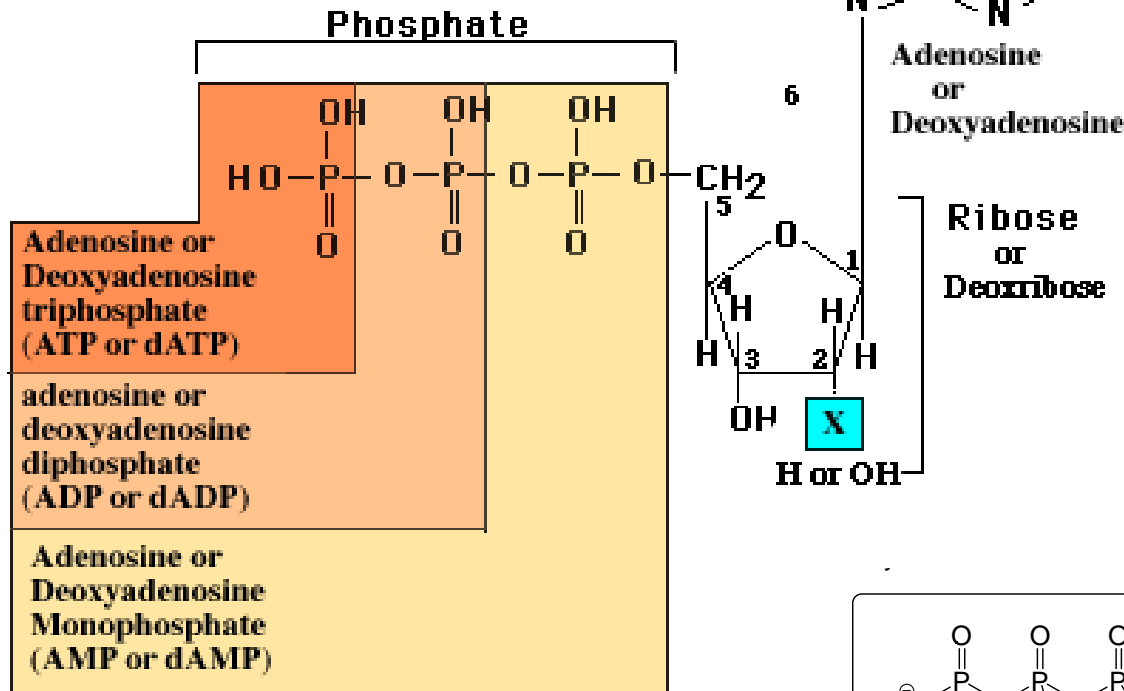
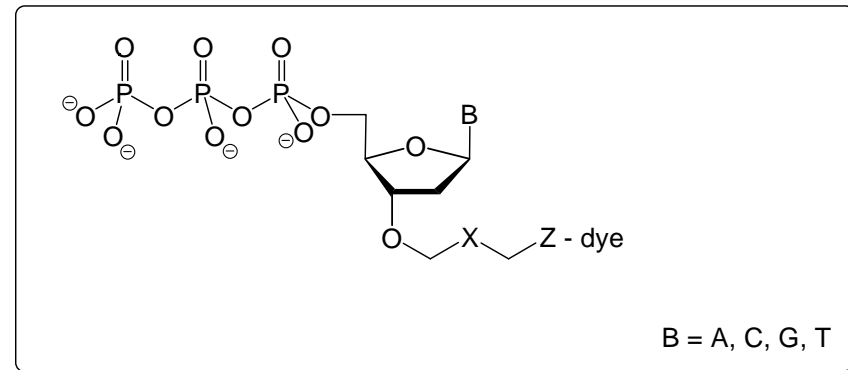


image from ntri.tamuk.edu/cell/nucleic.html



Kuidas sekveneerida?

- **Tsükliline sekveneerimine**

Kas sobib ULCS tehnoloogiaks?

Pluss:

Kõrge paralleelsus

Kiire skaneerimine

Korruga loetakse pikem ala kui SBH meetodite puhul

Miinus:

Vajalik genoomi osade unikaalne amplifitseerimine

Puuduvad sobivad nukleotiidid

Kuidas sekveneerida?

- **1 molekuli sekveneerimine**

Kas sobib ULCS tehnoloogiaks?

Pluss:

Pole vajalik genoomi osade unikaalne amplifitseerimine

Vähem algmaterjali

Võimalik näha ühe molekuli tasandil erinevusi – alt. splaising, haplotüübid inimese rakkudes

Miinus:

Detekteerimine (nõrk signaali tugevus)

Kuidas sekveneerida?

- **1 molekuli sekveneerimine (SMS)**

Solexa

Kiip kaetakse juhuslikus järjekorras asetsevate ühe genoomi fragmentidega. Iga molekul on eraldi detekteeritav.

Iga molekuli sekveneeritakse samaaegselt.

10^8 molekuli /cm².

ca 25 nukleotiidised fragmente võrreldakse teadaoleva inimese genoomi järjestusega

<http://www.solexa.com/technology/how.htm>

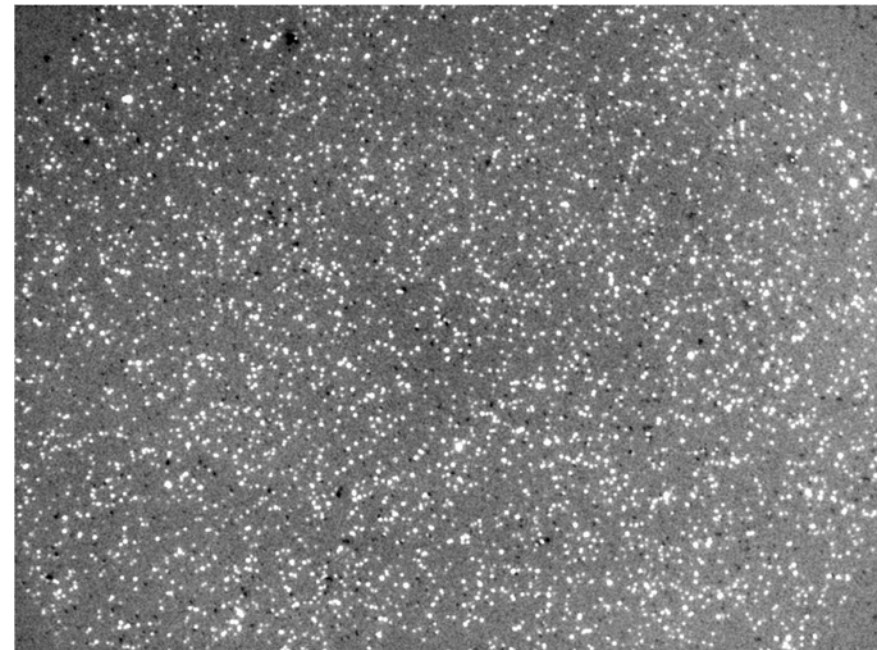
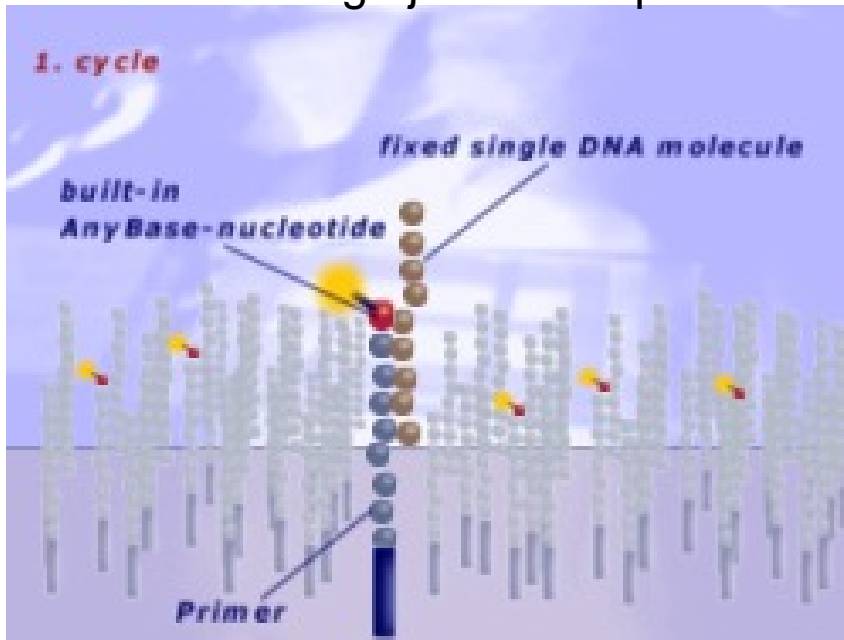
http://www.genovoxx.de/html/body_anygene_technology.html

Kuidas sekveneerida?

- 1 molekuli sekveneerimine (SMS)

Genovoxx

Sama põhimõte, mis Solexa tehnoloogial
400 nm vahedega juhuslikud praimerid



Lugemiskiirus 1.2M nukleotiidi tunnis

Kuidas sekveneerida?

- Nanopore sequencing**

Agilent

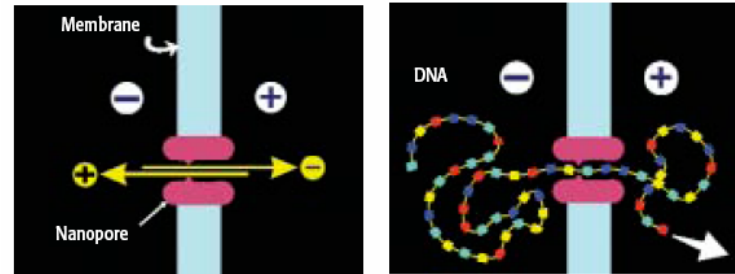
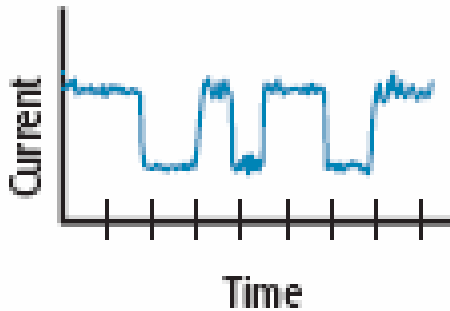


Figure 2. The concept of nanopore-based sequencing. As DNA moves through the pore (right), it blocks the transfer of ions (left), resulting in a changed current.

3. DNA sequencing



Vajalik 1 poor/kanal membraani kohta

Poor võib olla looduslik valk (alpha-hemolüsiini molekul) või sünteetiline (silikoon-nitriid)

Vool suurusjärgus pA

Vajalik 15 molekuli, et detekteerida 99.9% täpsusega

Hetkel võimalik vaid 1 terminaalse nukleotiidi detekteerimine

<http://www.pharmagenomicsonline.com/pharmagenomics/article/articleDetail.jsp?id=90380>

<http://scicom.ucsc.edu/SciNotes/0201/lo/dna/>

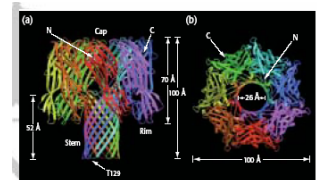


Figure 1. Alpha-hemolysin, a naturally occurring nanopore.

Kuidas sekveneerida?

- **Muud metoodikad**

single molecule DNA synthesis, with real-time detection

Visigen

LI-COR

<http://www.visigenbio.com/tech.html>

<http://www.licor.com/>

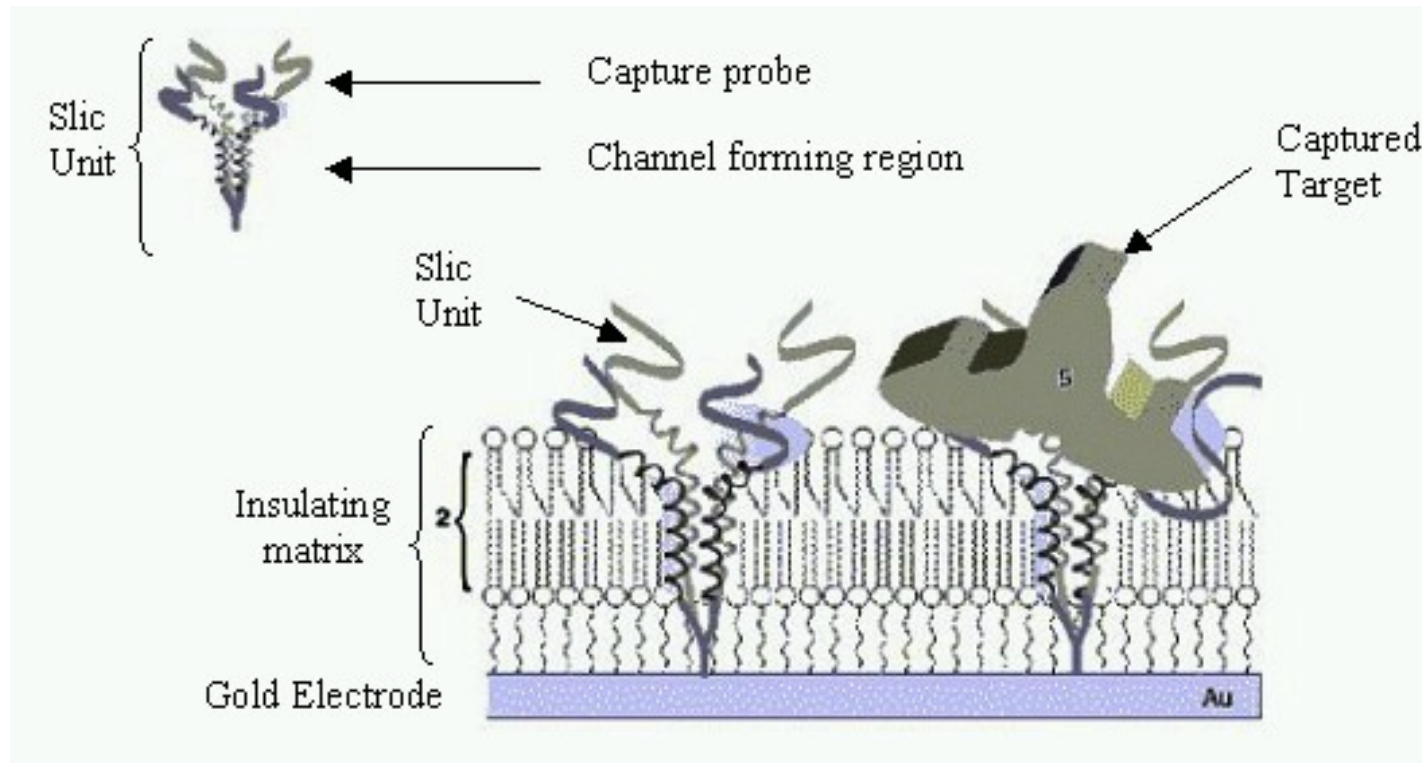


Kuidas sekveneerida?

- **Muud meetodikad**

Ayanda Biosystems, <http://www.ayanda-biosys.com/>

synthetic ligand-gated ion channels (SLICs)



Kirjandus

- *Shendure et al.* ADVANCED SEQUENCING TECHNOLOGIES: METHODS AND GOALS. Nature Reviews Genetics 5: 335 (2004)
- Genovoxx GmbH
<http://www.genovoxx.de/>
- Solexa Ltd.
<http://www.solexa.com/technology/overview.htm>