

Секвенирлеу әдістері: Sanger және NGS

CHE9131 ДНҚ технологиялары · 6B05105 Биотехнология
7-апта · Жаниязов Ж.А., аға оқытушы

Дәріс жоспары

- ДНҚ секвенирлеудің мәні мен тарихы
- Сэнгер әдісі
- Жаңа буын секвенирлеуі (NGS)
- Платформаларды салыстыру
- Деректерді талдау

7 / 15

апта • секвенирлеу

Секвенирлеу сандармен

1977

Ф. Сэнгер тізбекті үзу
әдісін ұсынды

≈800

Сэнгер әдісінің оқу
ұзындығы, н.

99,99%

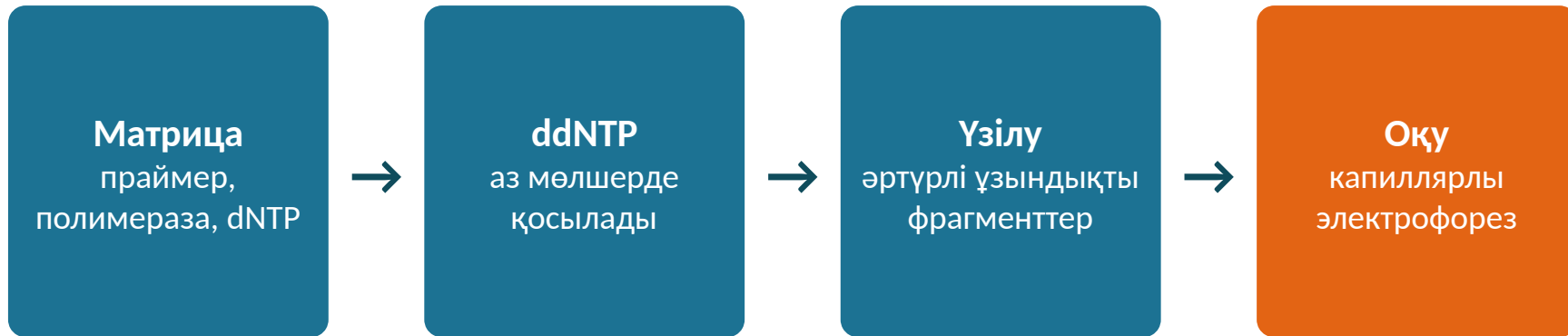
Сэнгер әдісінің дәлдігі

2005

алғашқы NGS
платформалары

Секвенирлеу — ДНҚ-дағы нуклеотидтердің нақты ретін анықтау.

Сэнгер әдісінің принципі



Әр ddNTP өз түсімен таңбаланған: детектор соңғы нуклеотидті анықтайды.

Дидезоксинуклеотидтер

- ddNTP-да 3'-ОН тобы жоқ, сондықтан тізбек ары қарай ұзармайды
- Төрт нуклеотид төрт түсті флуоресценттік бояумен таңбаланған
- Фрагменттер капилляр арқылы өлшемі бойынша өтеді
- Нәтиже — хроматограмма: әр шың бір нуклеотид

ddNTP

тізбекті тоқтатады

NGS жалпы схемасы



NGS бір мезгілде миллиондаған фрагментті параллель оқиды.

NGS платформалары

Платформа	Ерекшелігі
Illumina	Қысқа оқулар (50–300 н.), жоғары дәлдік
Ion Torrent	Нуклеотид қосылғанда pH өзгерісін анықтайды
PacBio (SMRT)	Ұзын оқулар, бір молекуланы нақты уақытта оқу
Oxford Nanopore	Нанопора арқылы ұзын оқулар, портативті құрал

Sanger және NGS салыстыру

Белгі	Sanger	NGS
Өнімділік	бір реакцияда бір фрагмент	миллиардтаған оқу
Геномға шаққандағы құны	жоғары	төмен
Қолдану	плазмида, ПЦР өнімін тексеру	геном, транскриптом, метагеном

Деректерді талдау

Сапаны бағалау

Phred көрсеткіші, Q30 — 99,9% дәлдік

Құрастыру

Оқуларды бір ұзын тізбекке жинау (assembly)

Туралау

Оқуларды референс геномға салыстыру (mapping)

Нұсқаларды табу

SNP және indel анықтау

Қорытынды және бақылау сұрақтары

- Сэнгер әдісінде ddNTP не үшін керек?
- NGS-тің басты артықшылығы неде?
- Қысқа және ұзын оқулардың айырмасы қандай?
- Q30 нені білдіреді?
- Тапсырма: ПР №7, топтық жоба «ДНҚ секвенирлеу әдістері»

130–139

бет • [1] Brown