

Как собрать ваш ген из букв

несколько практических советов для начинающих

27 февраля 16:00
Конференц-зал ИЦиГ
Публичная лекция
Геннадия Васильева



Немного истории

1977 г. - Первый полный геном бактериофага Ф-Х174 (5386 нуклеотидов) секвенирован методом Shotgun

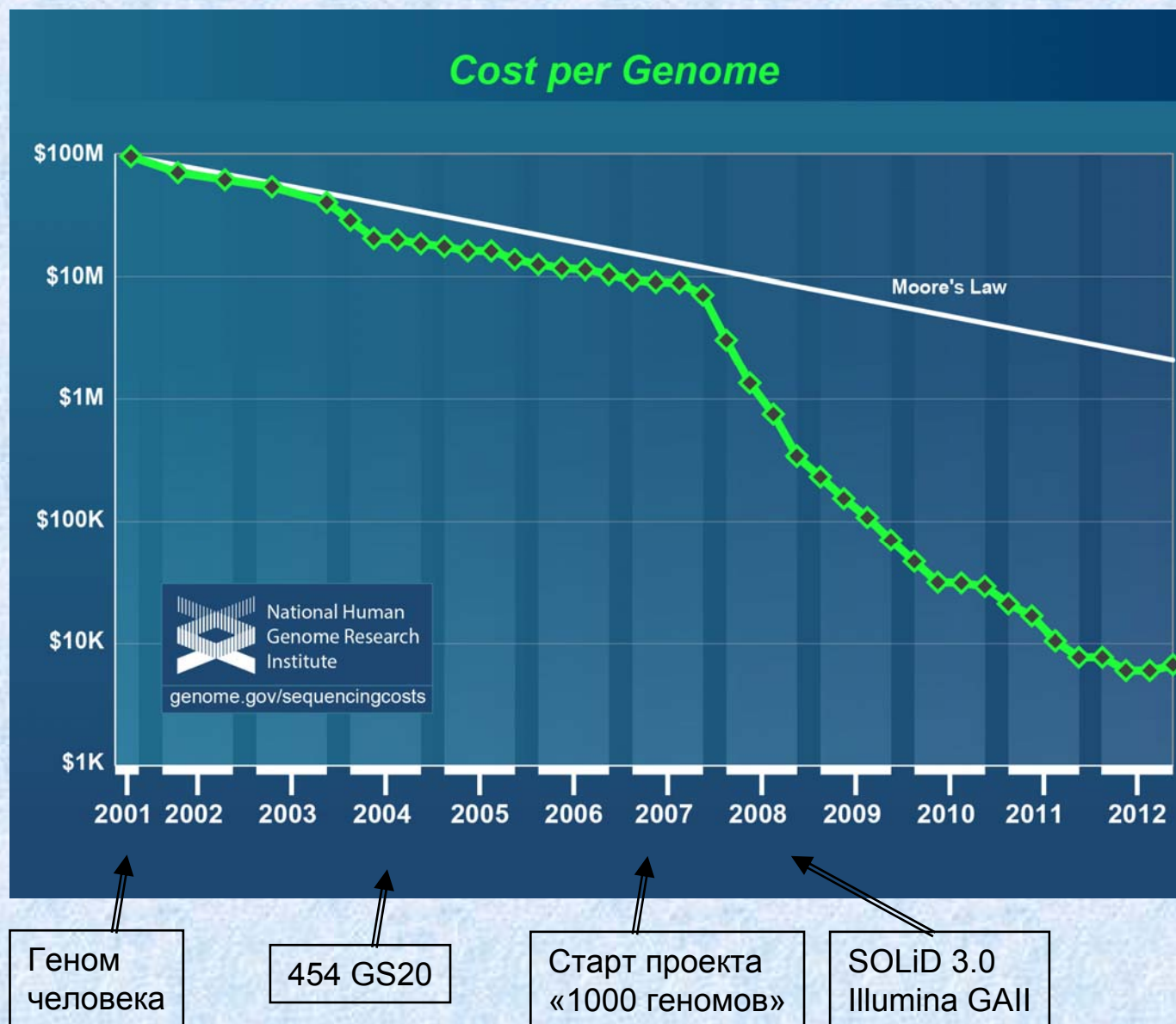
1995 г. – секвенирование генома первого свободноживущего организма – бактерии *Haemophilus influenzae*.

Проект «Геном человека» - 1990 – 2003 - 2006 гг.,
стоимость -15 млрд.\$.
Секвенировано 92,3% генома.

2010 г. – завершён проект «тысяча геномов», для
каждого персонального генома человека секвенировано
70 - 85% последовательности.



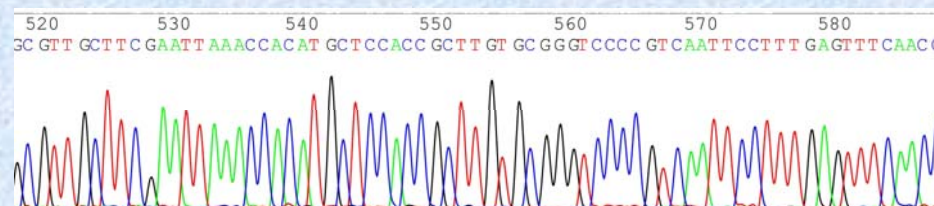
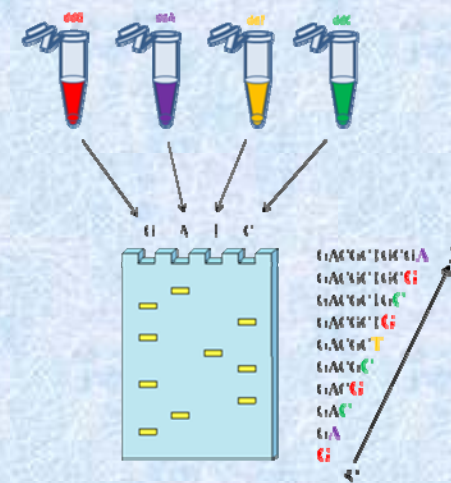
Стоимость секвенирования условного генома человека



Первое поколение – секвенирование по Сэнгеру



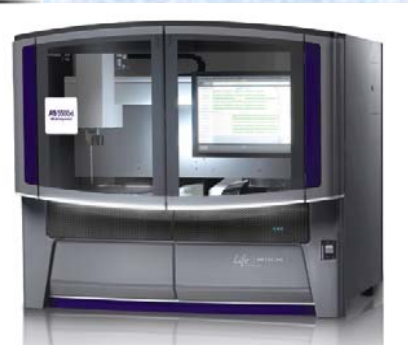
96-capillary ABI 3730XL



Второе поколение – массовое параллельное секвенирование

High throughput models

	454-FLX Titanium	Illumina HiSeq	SOLiD 5500
Read length (bp)	240–400–700	2x100	2 x 50
Human genome resequencing cost (\$)	50 000	Менее 10 000	Менее 10 000



Medium throughput models

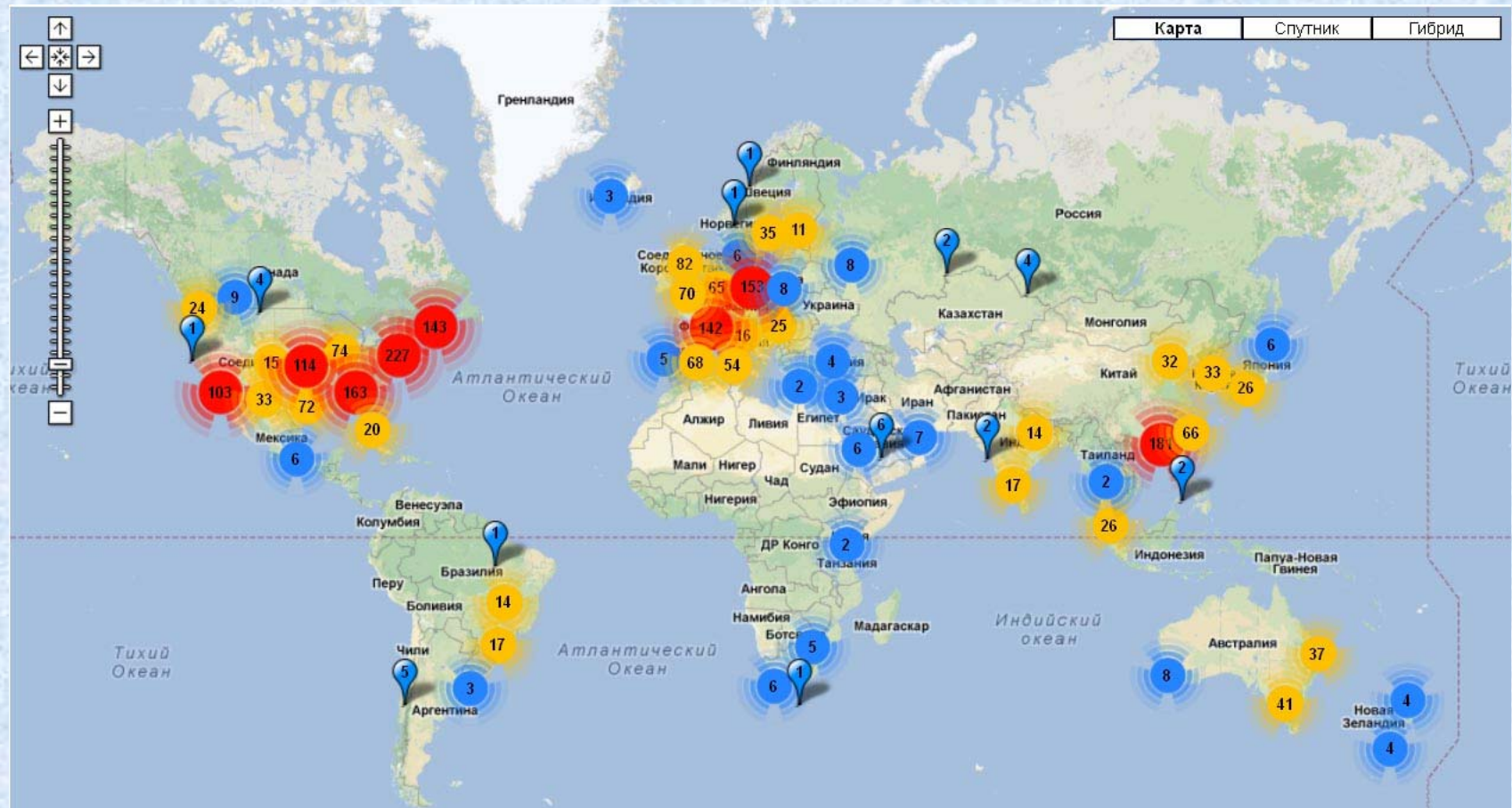
	454 Junior	Ion Torrent
Read length (bp)	240–400	100–200
Human genome resequencing cost (\$)	N/A	N/A



Третье поколение – одномолекулярные секвенаторы «Имя им – легион»



Карта расположения высокопроизводительных секвенаторов второго и третьего поколений



Что доступно нам



Секвенирование по Сэнгеру –
ABI 3730xl, 3130xl



SOLiD 5500



Ion Torrent

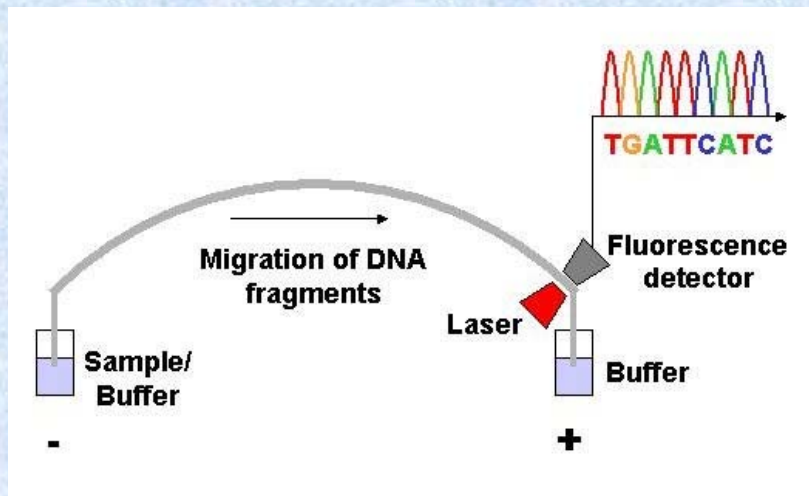


GS FLX



Illumina MySeq

Это многократный синтез
с одной и той же матрицы

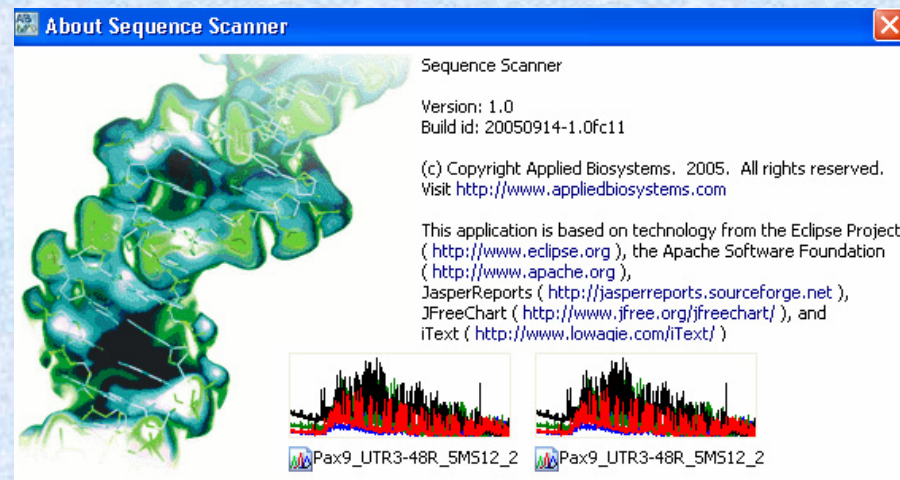


Как получить хорошие сиквенсы и сэкономить BigDye

- Обязательно использовать буфер для секвенирования, ставить реакцию в объёме 15-20 мкл
- Использовать следующую программу: 95°C -1 min;
98°C – 10 sec, 50°C – 10 sec, 60°C – 4 min; 35-40 циклов
- Брать в реакцию необходимые количества праймеров (3-5 pM) и ДНК (0.5 pM; удобный расчёт - 200-300 нг фрагмента 1000 п.о.)
- Использовать хорошо очищенную ДНК и не деградированный праймер
- Качественно очистить образец после проведения реакции Сэнгера

Как извлечь максимум информации из файла секвенограммы

Первый шаг – извлечь максимум адекватной информации из имеющихся данных

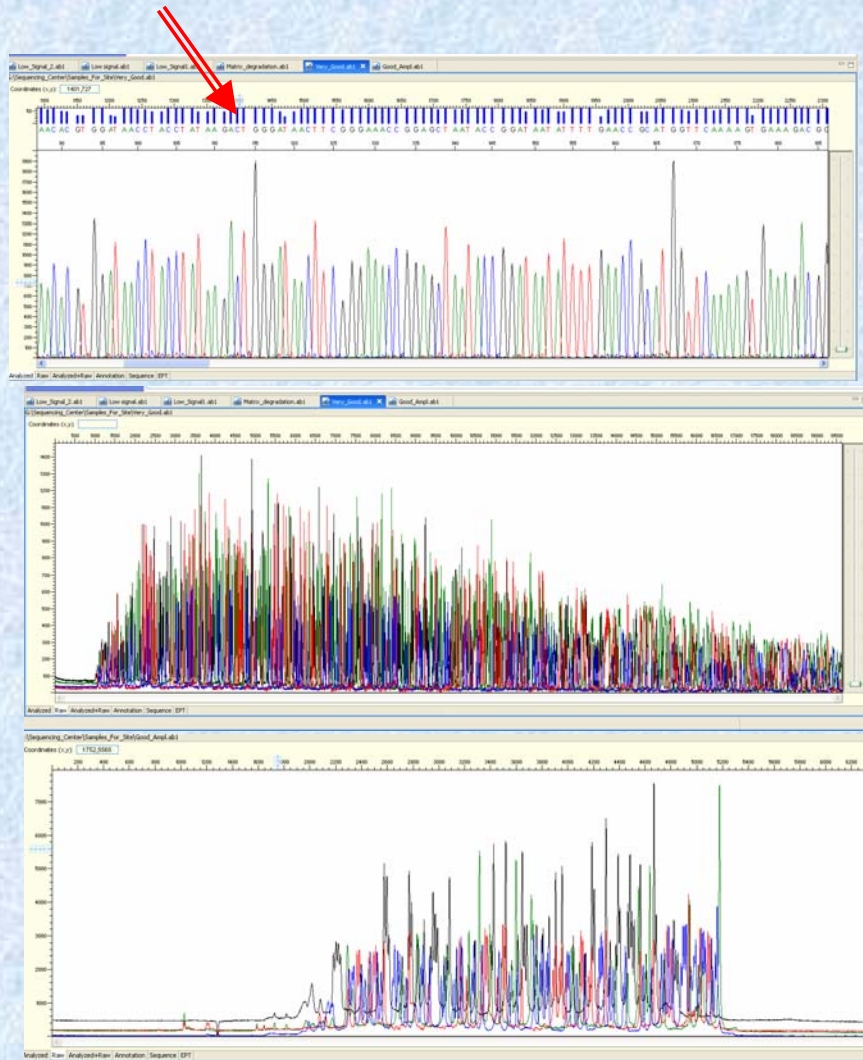


Рекомендуемая нами программа Sequence Scanner

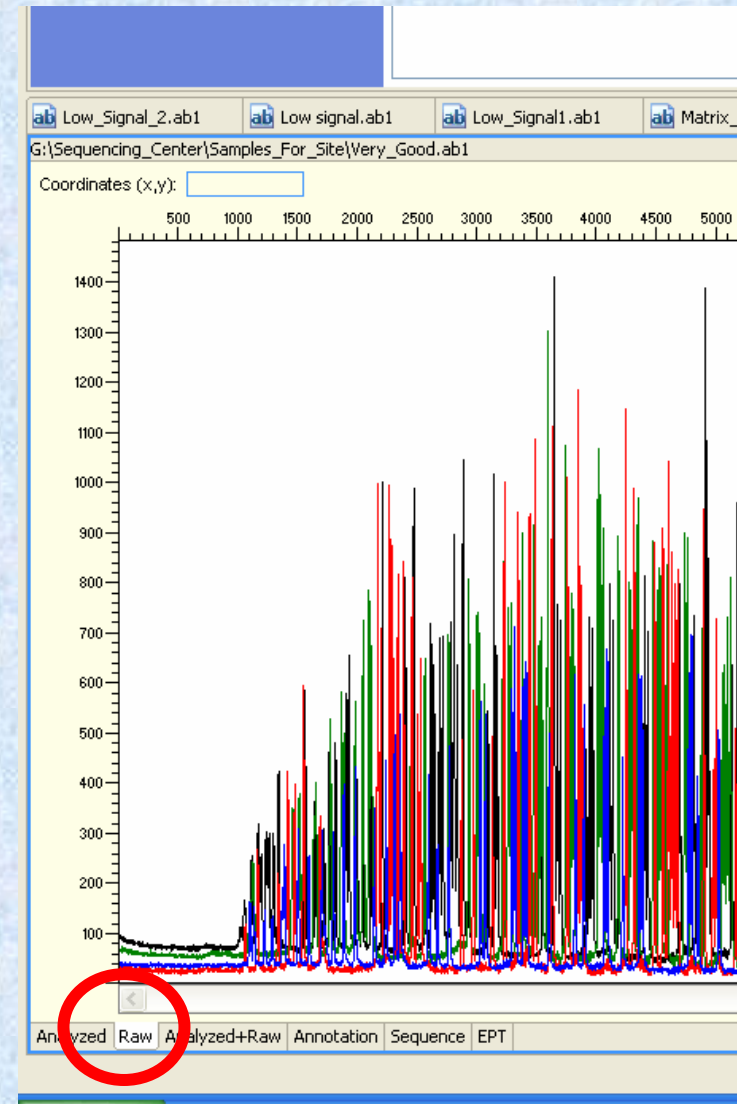
Как извлечь максимум информации из файла секвенограммы

$$Q = -10 \log_{10} P_i$$

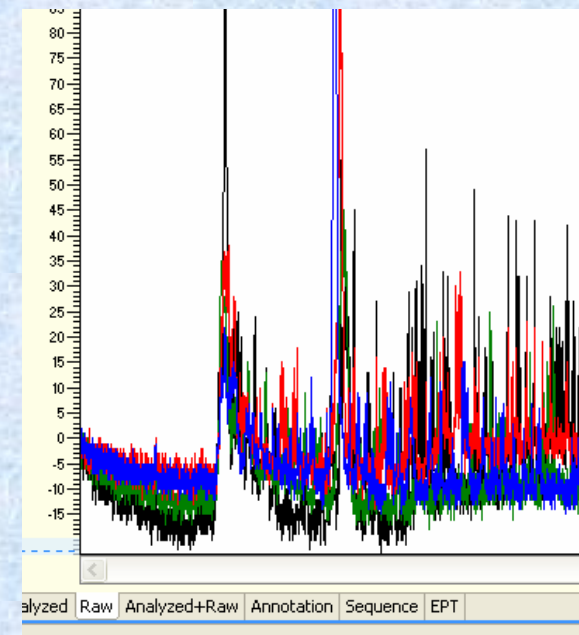
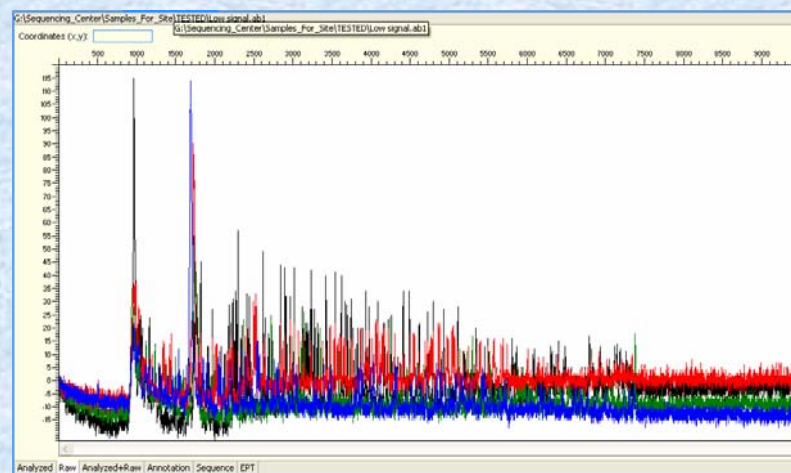
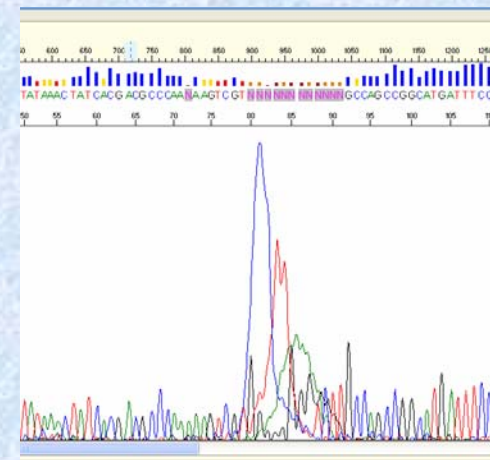
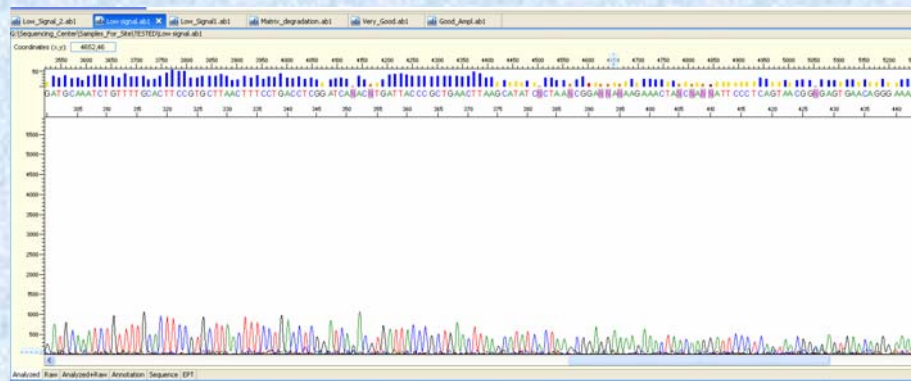
Phred 10 = 90% точность, Phred 20 = 99%, Phred 30 = 99,9%,



Хороший сиквенс

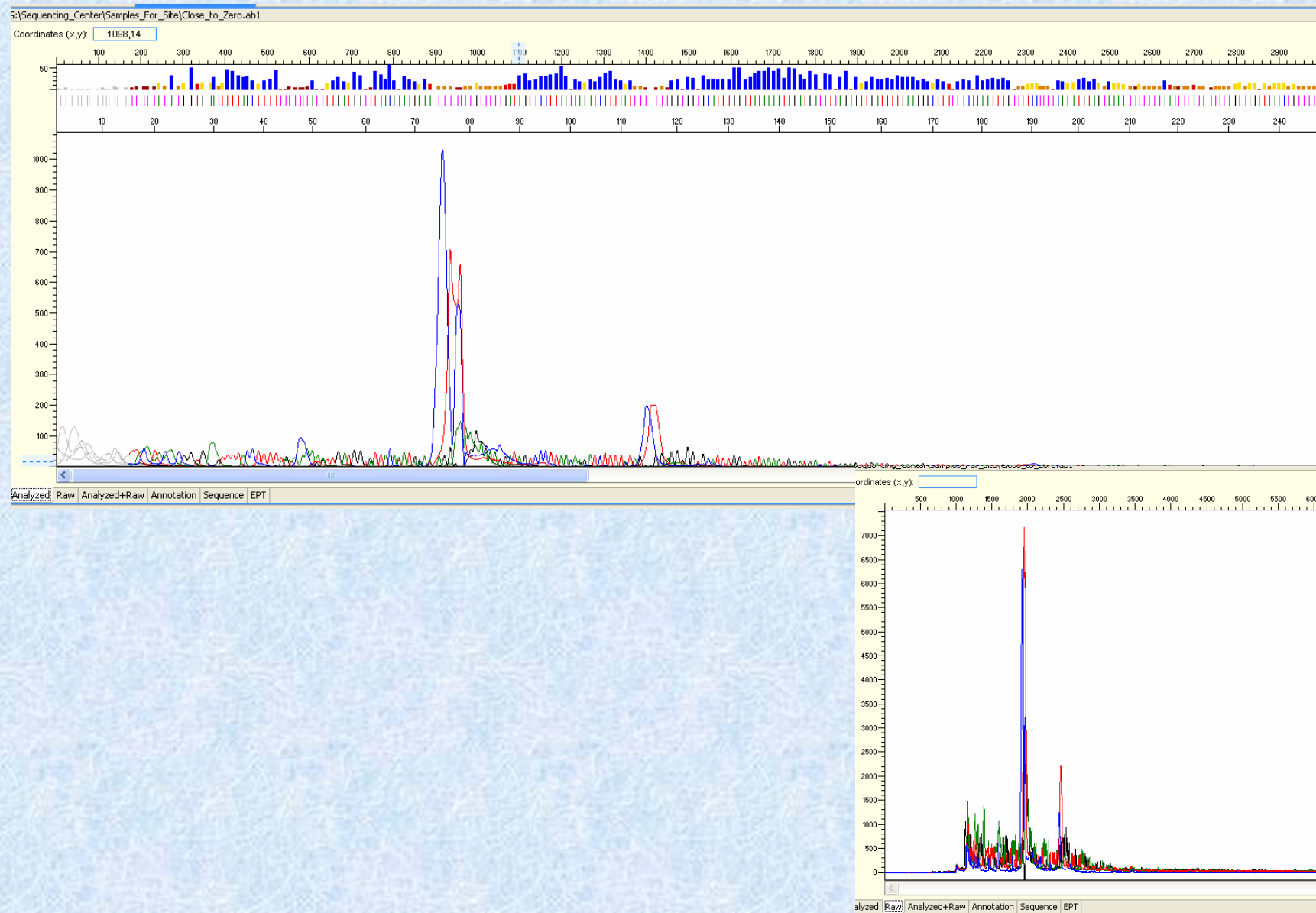


Как извлечь максимум информации из файла секвенограммы

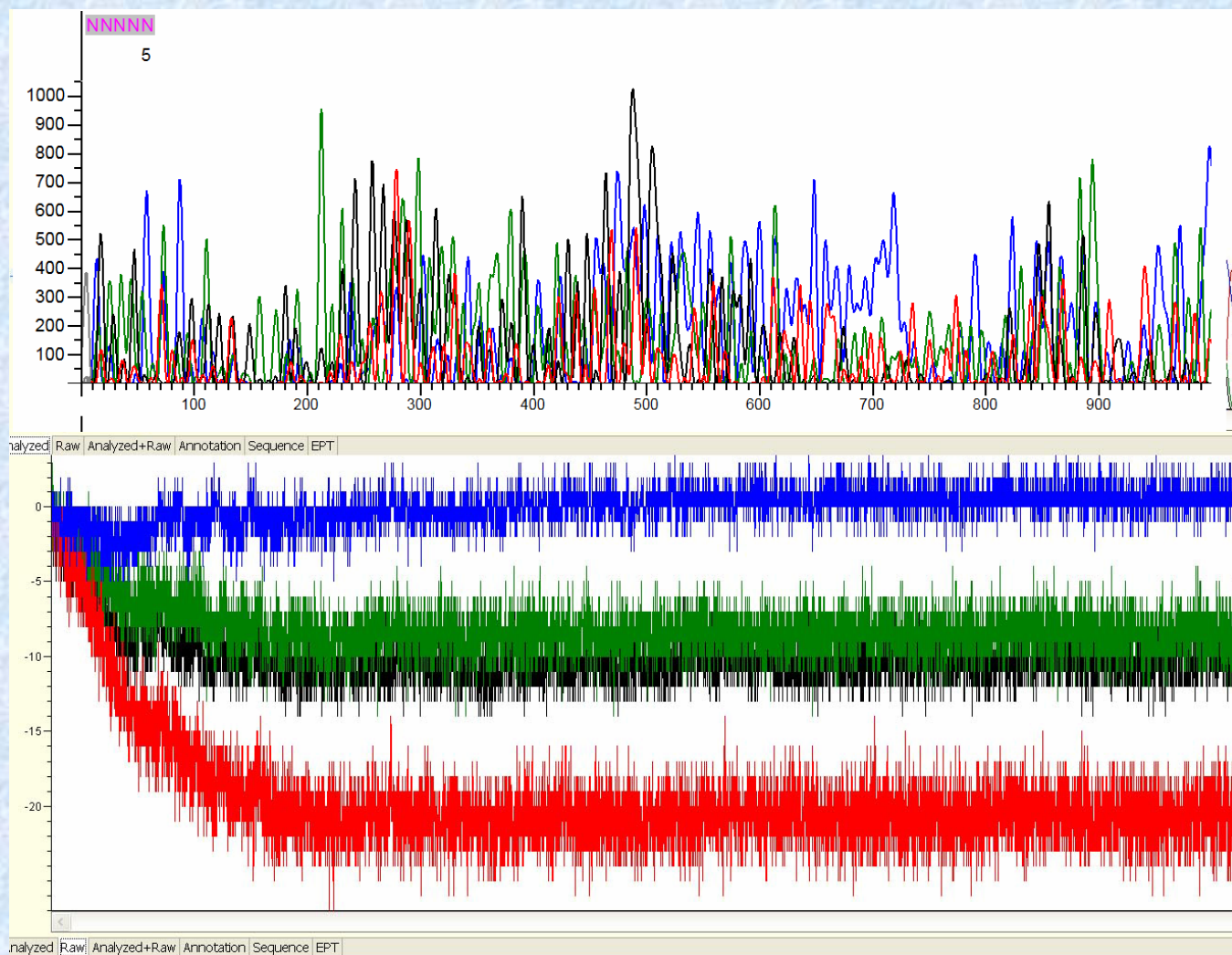


Маргинальный сиквенс

Ещё один маргинальный сиквенс



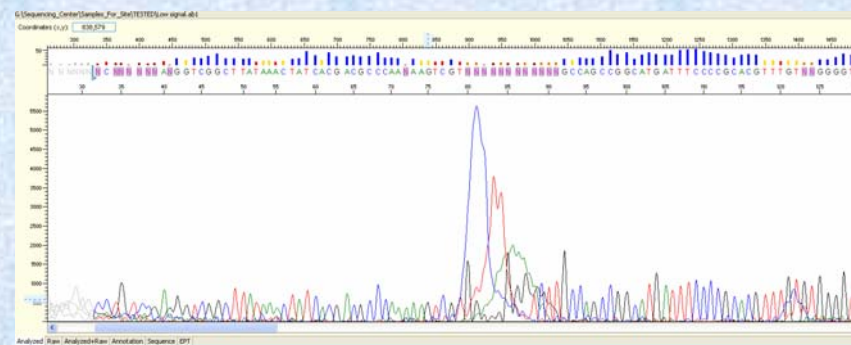
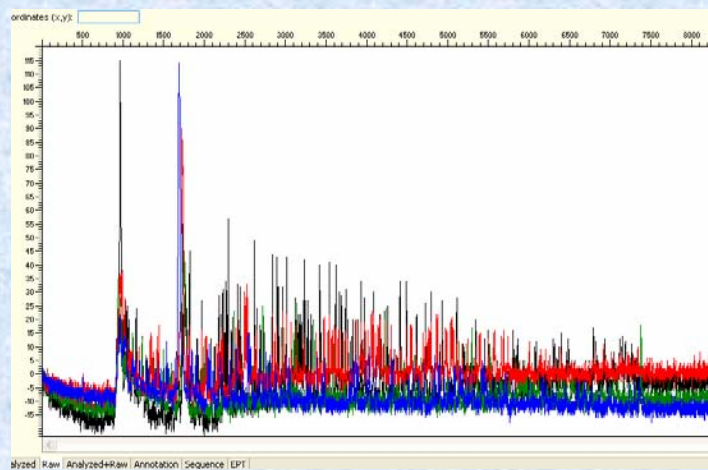
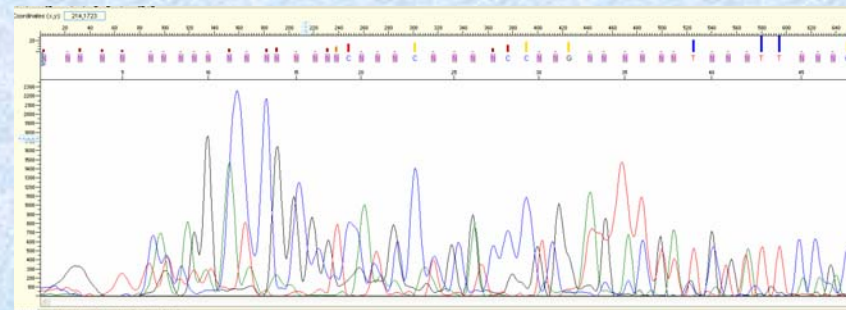
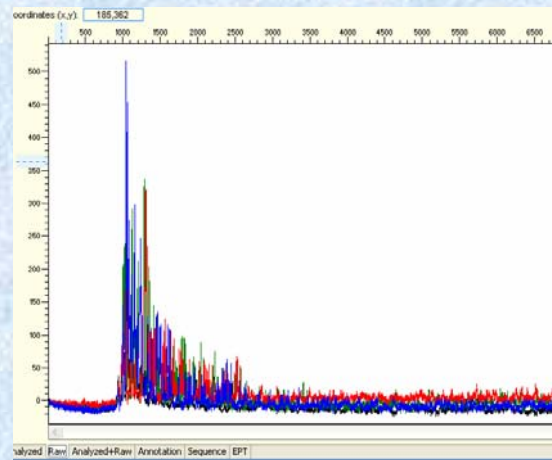
Полный ноль



Основные классы проблем

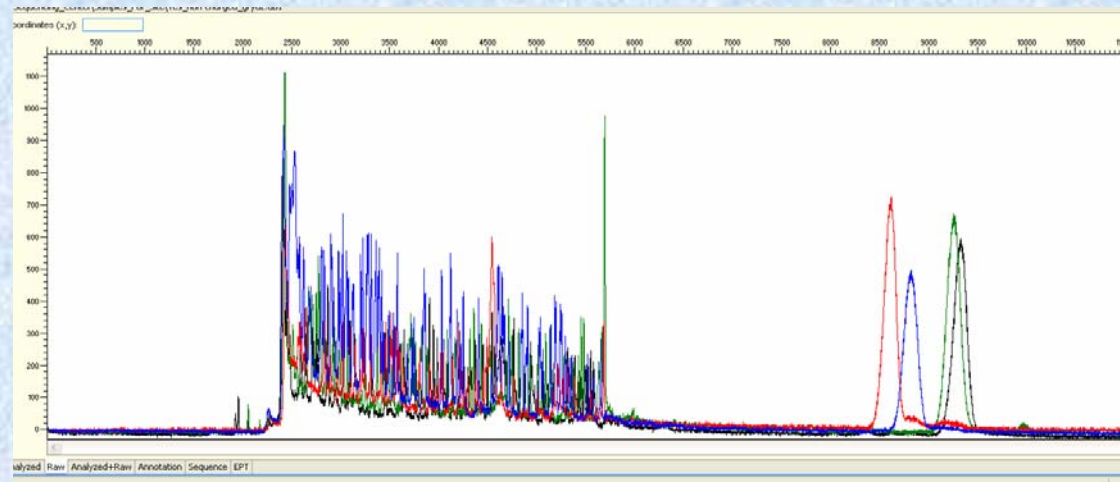
- Проблемы, связанные с качеством/количеством ДНК и праймера
- Проблемы, связанные с аккуратностью работы или интерпретации последовательности
- Проблемы самого прибора, в т.ч. нанесения
- Проблемы с праймером, специфичностью
- Особенности самой матрицы

Проблемы в проведении реакции

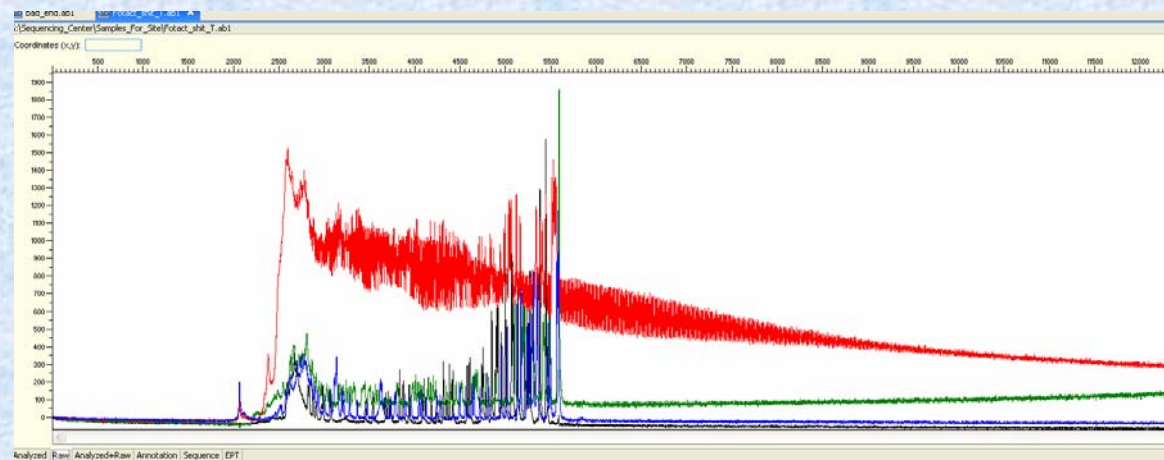


Мало ДНК и/или присутствуют сильные ингибиторы реакции

Примеры грязи в образцах

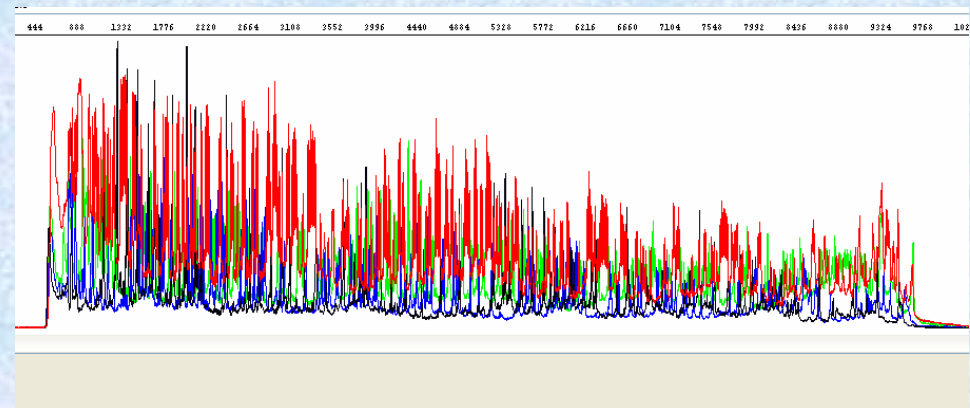
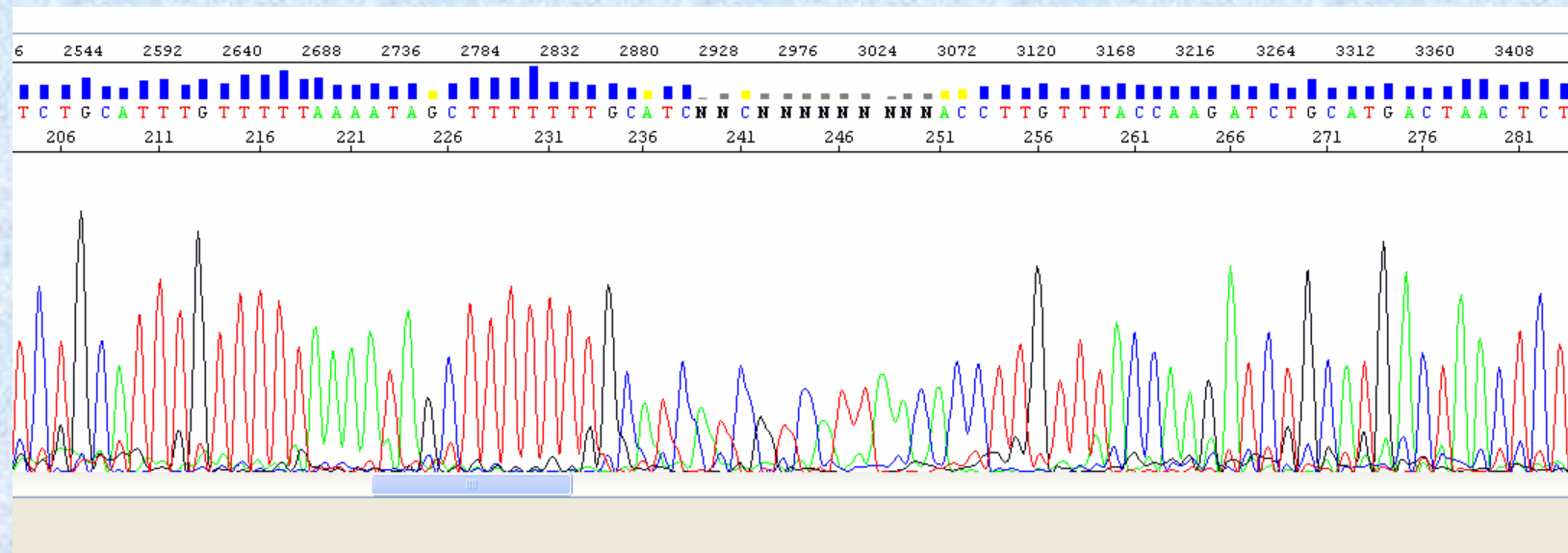


Инертная грязь

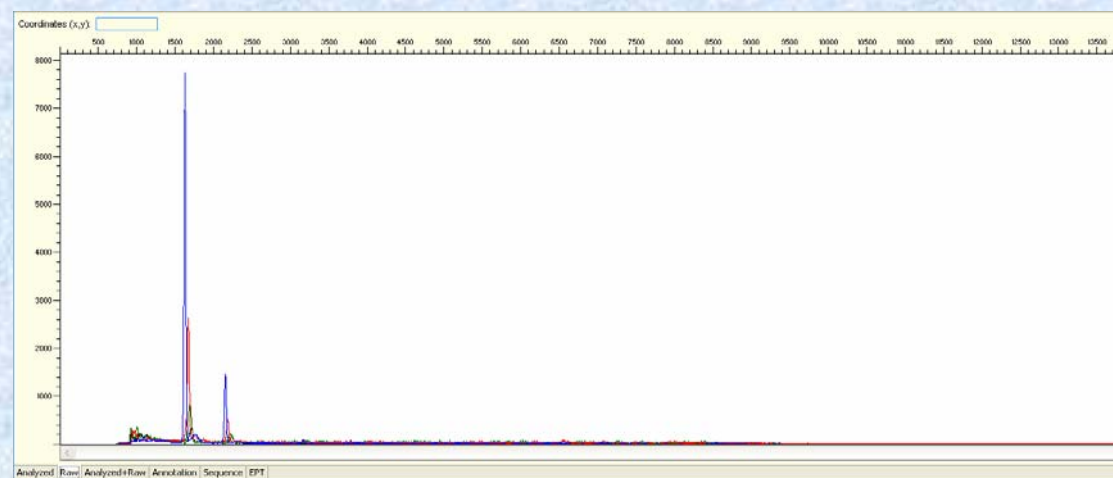
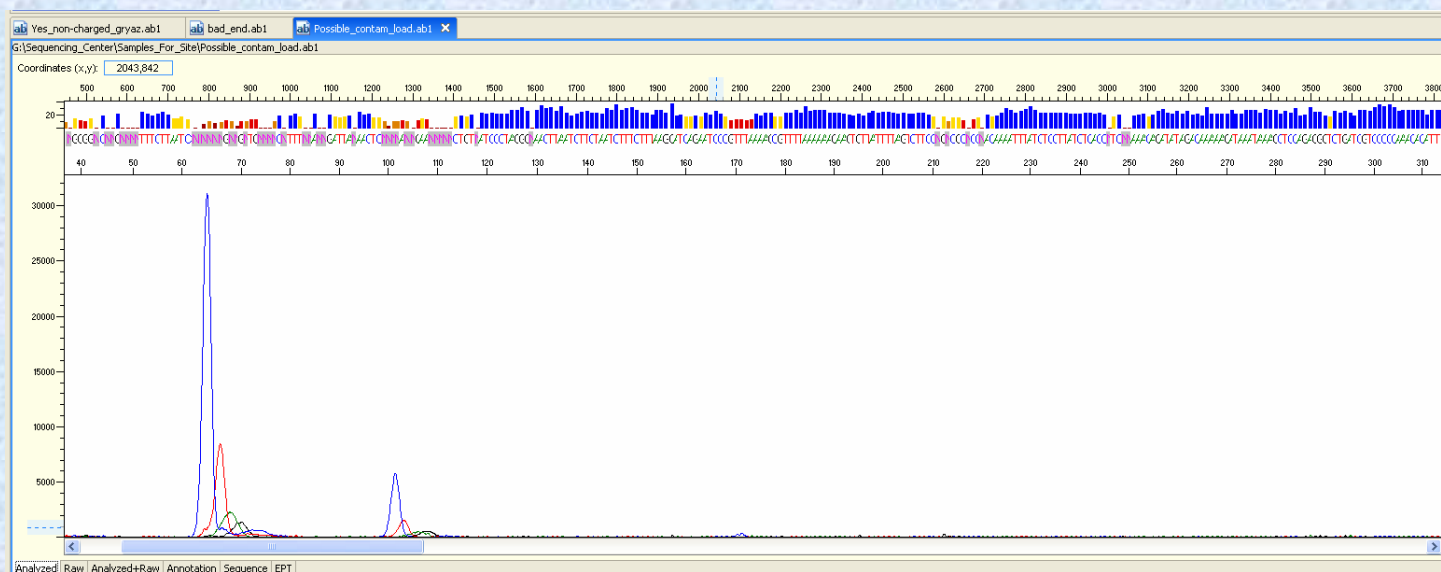


Флюоресцирующая грязь

RNA в образце

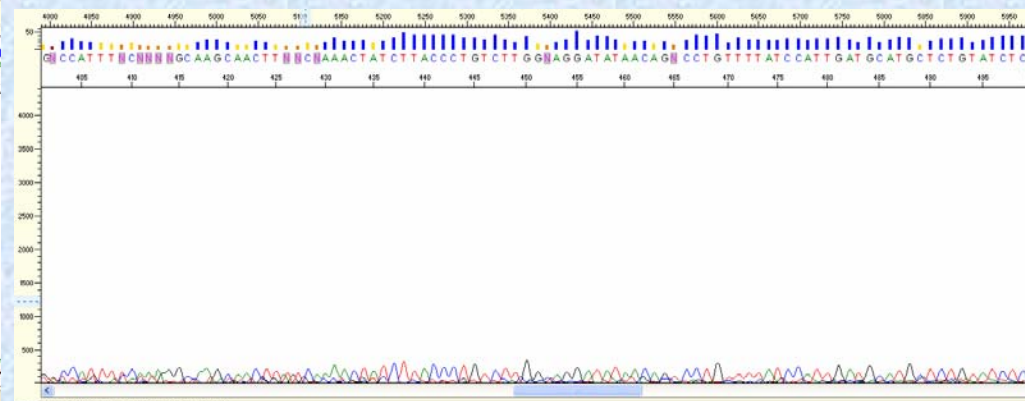
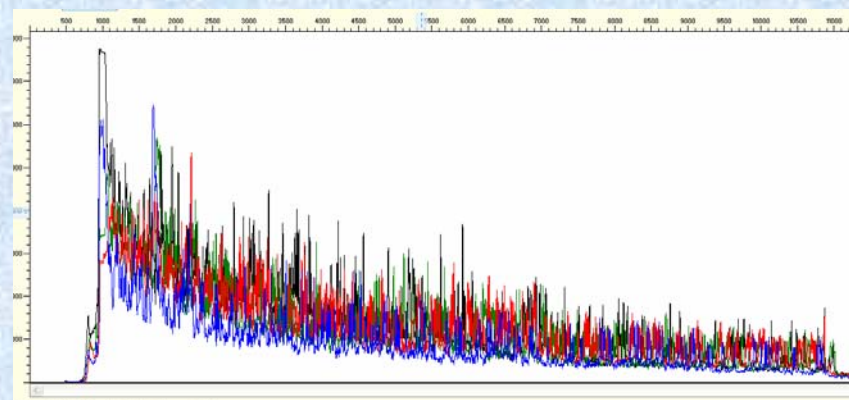
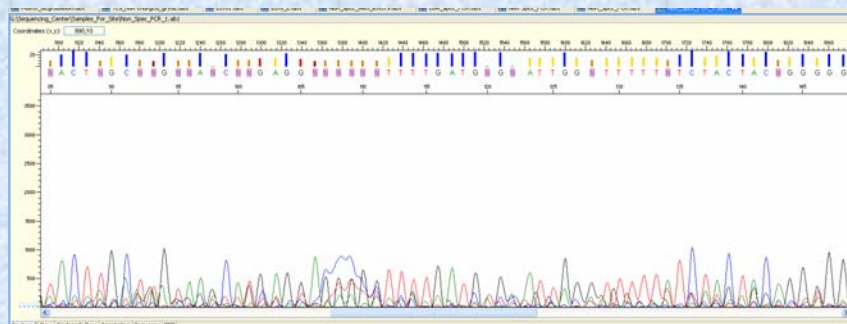


Проблемы в проведении реакции



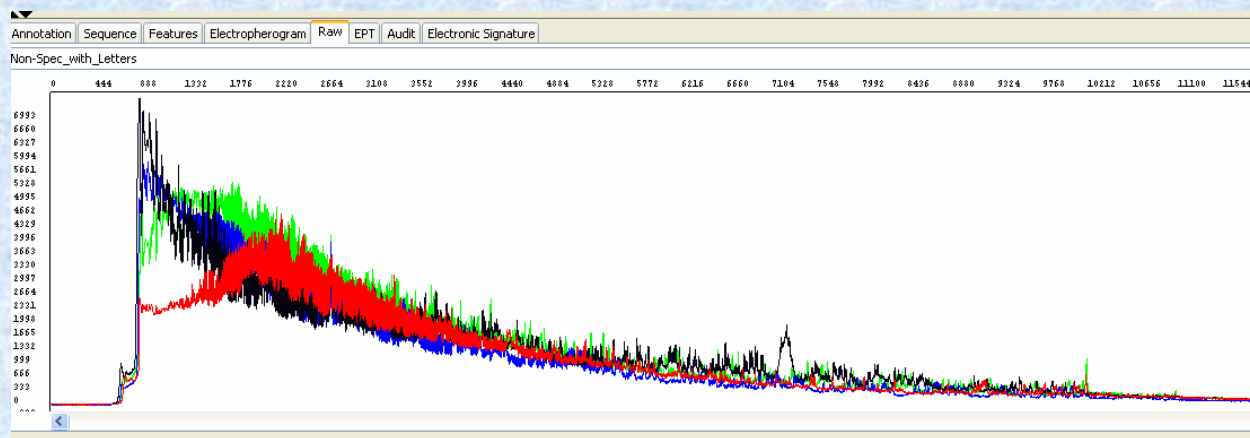
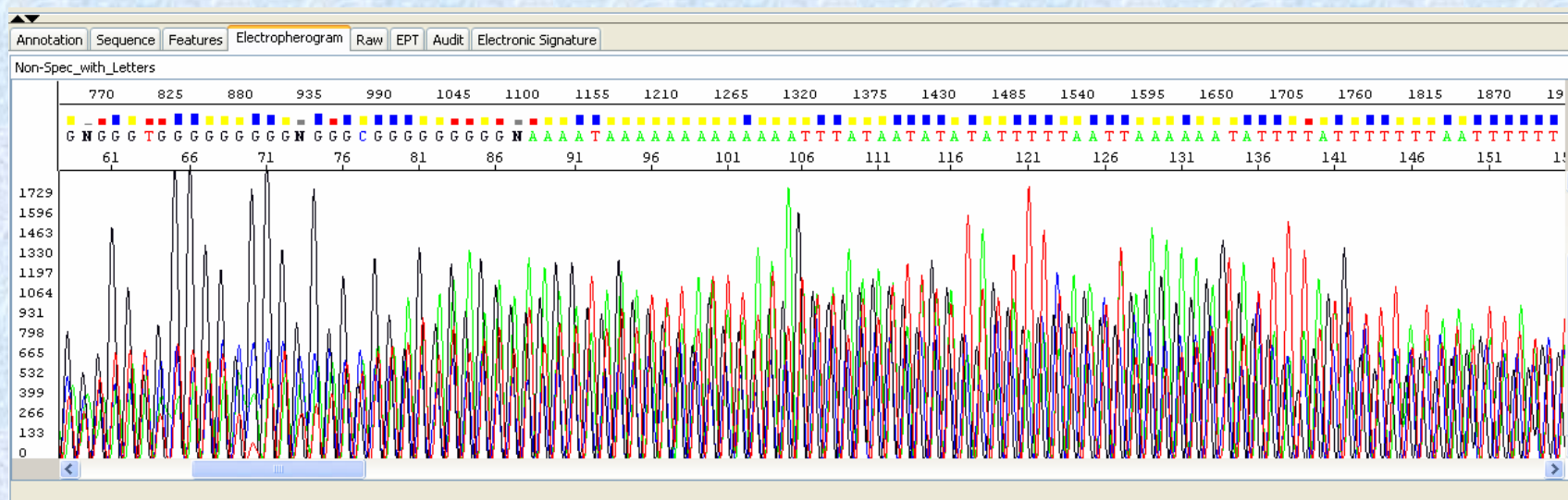
Мало праймера

Неспецифичная ПЦР – химерная последовательность

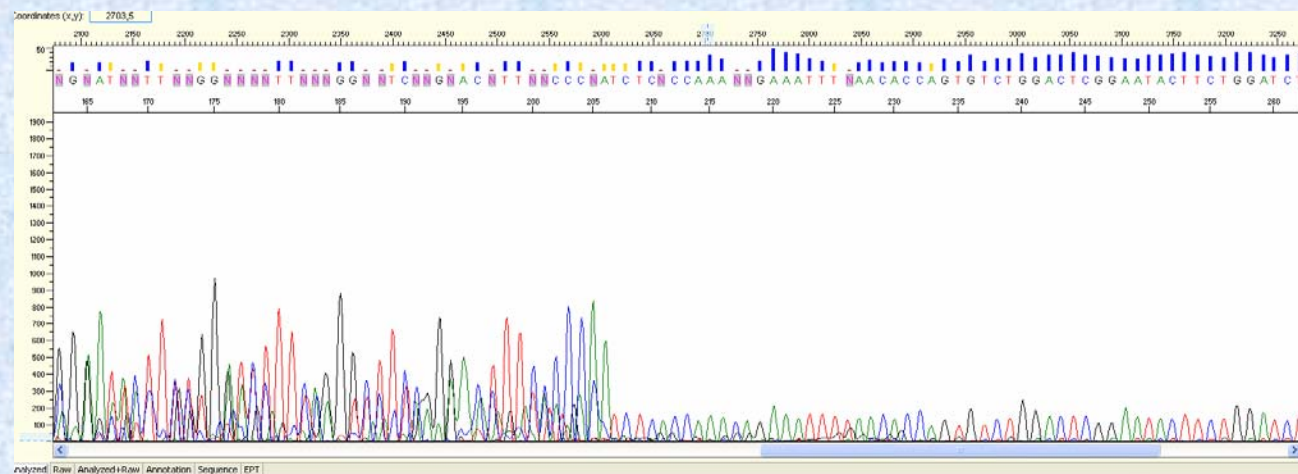
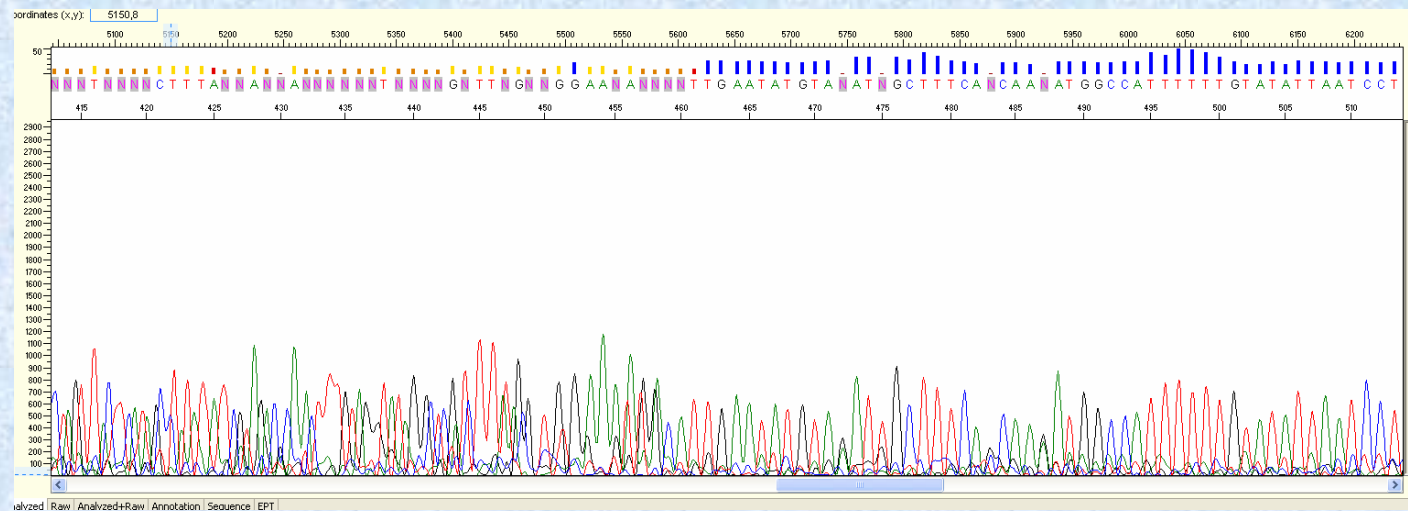


Неверная интерпретация

Неспецифичная ПЦР – химерная последовательность

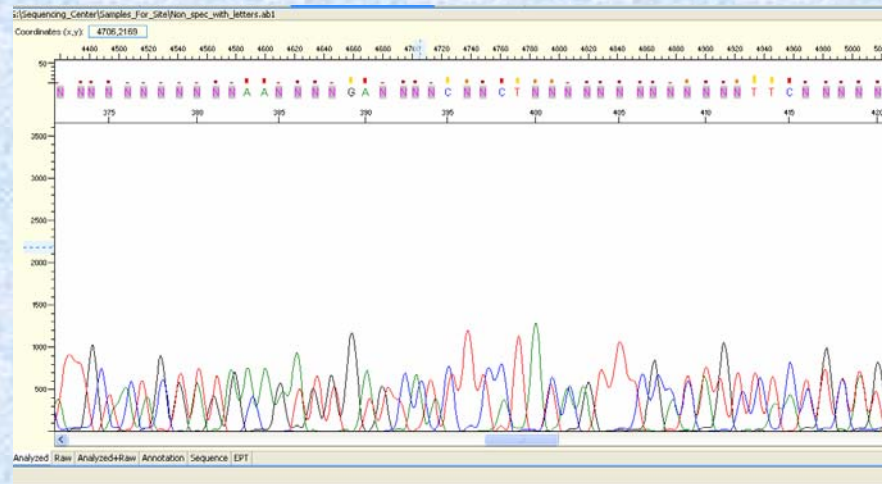


Проблемы со специфичностью

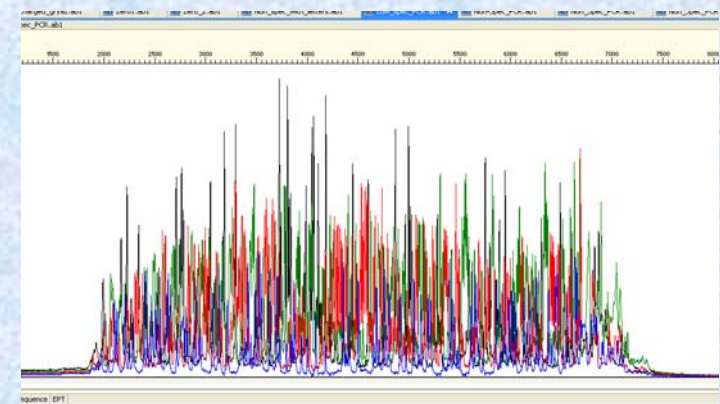
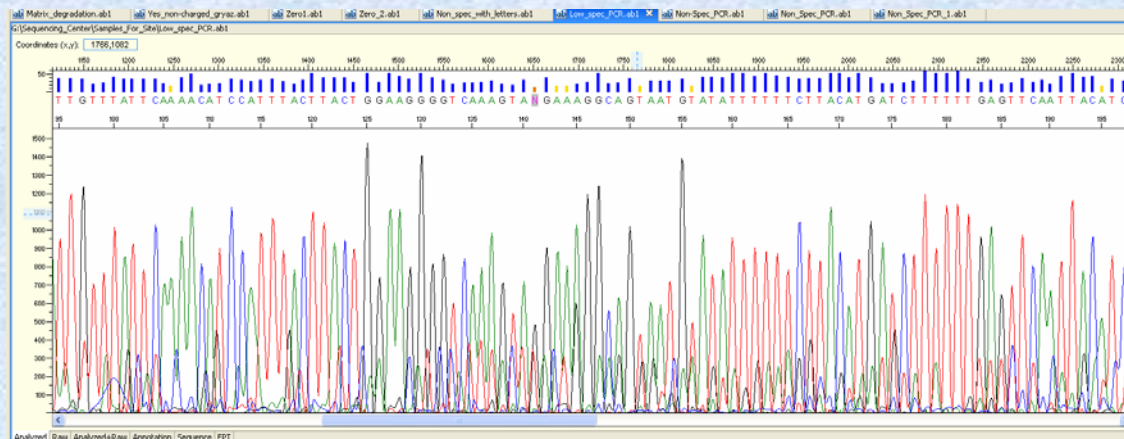


Смесь двух ампликонов

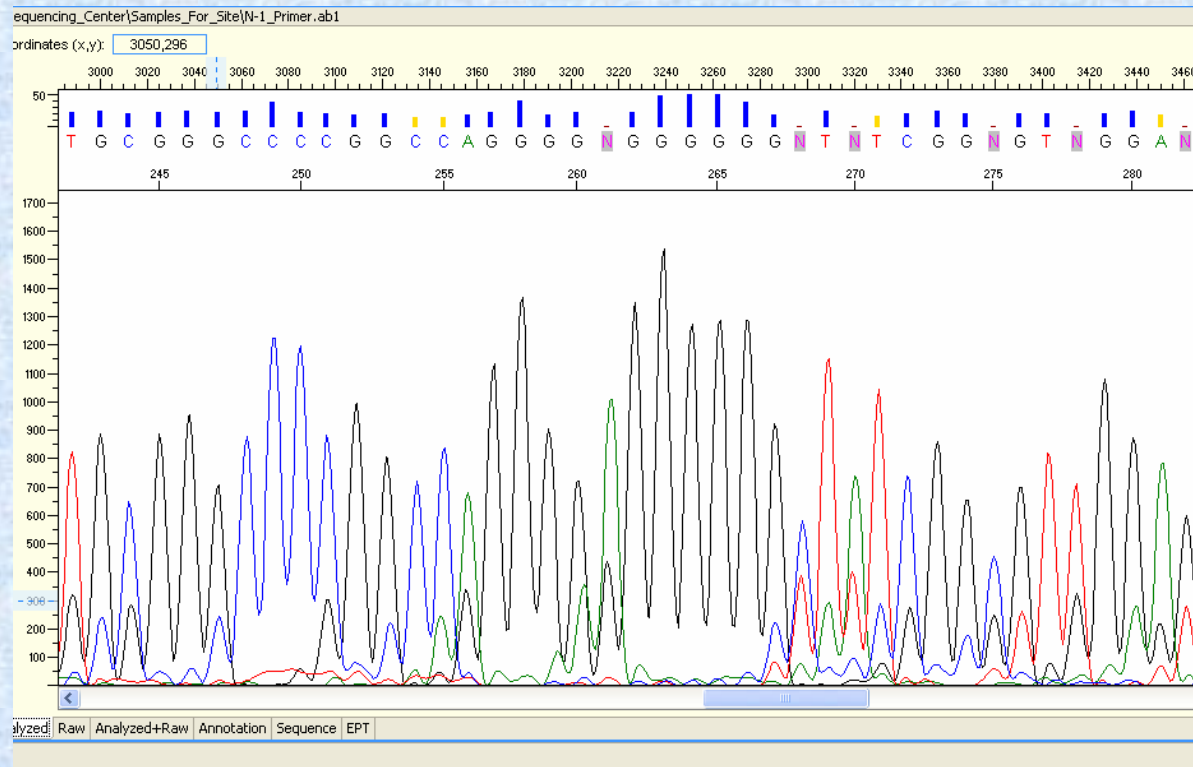
Проблемы с праймером, специфичностью



Смесь двух праймеров в реакции

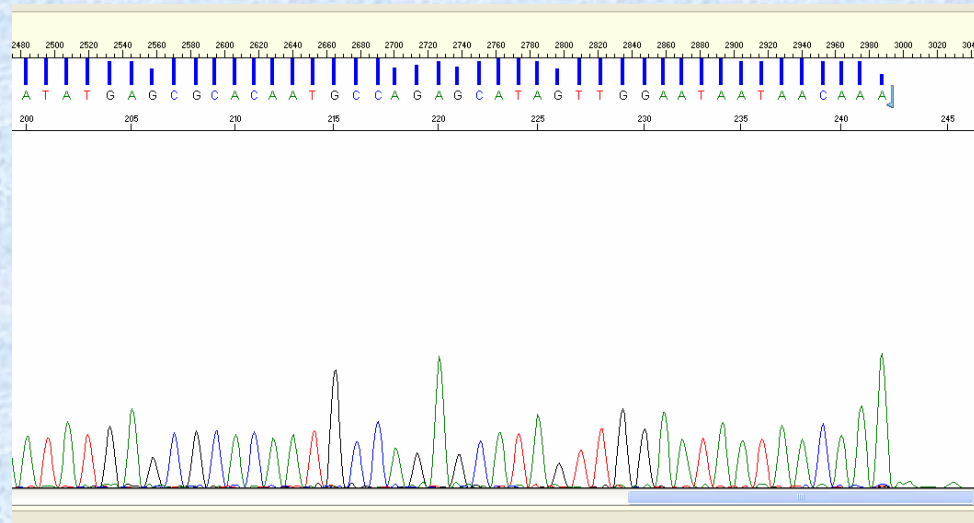


Проблемы с праймером

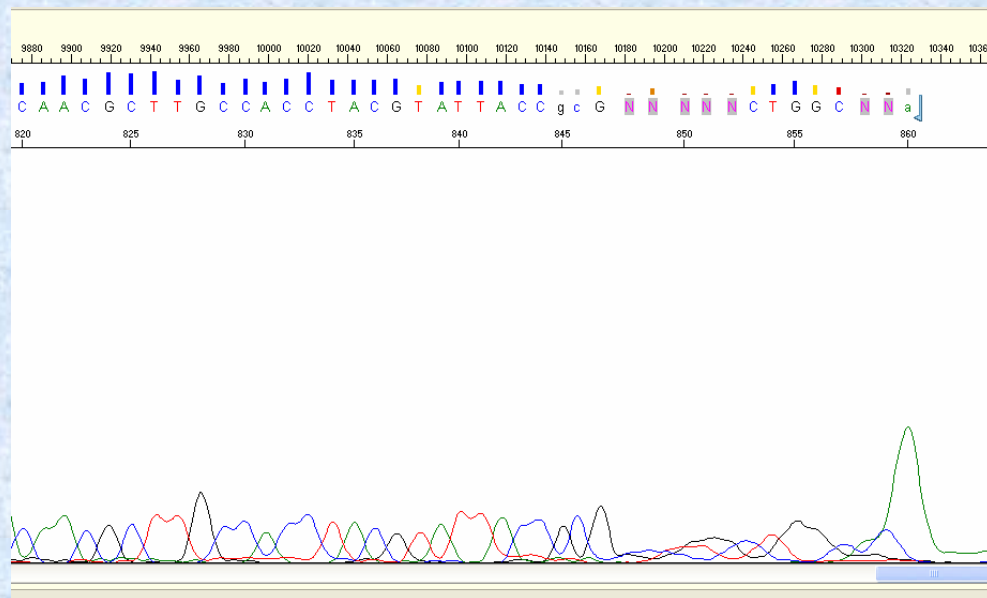


N-1 праймер

Проблемы с праймером, специфичностью

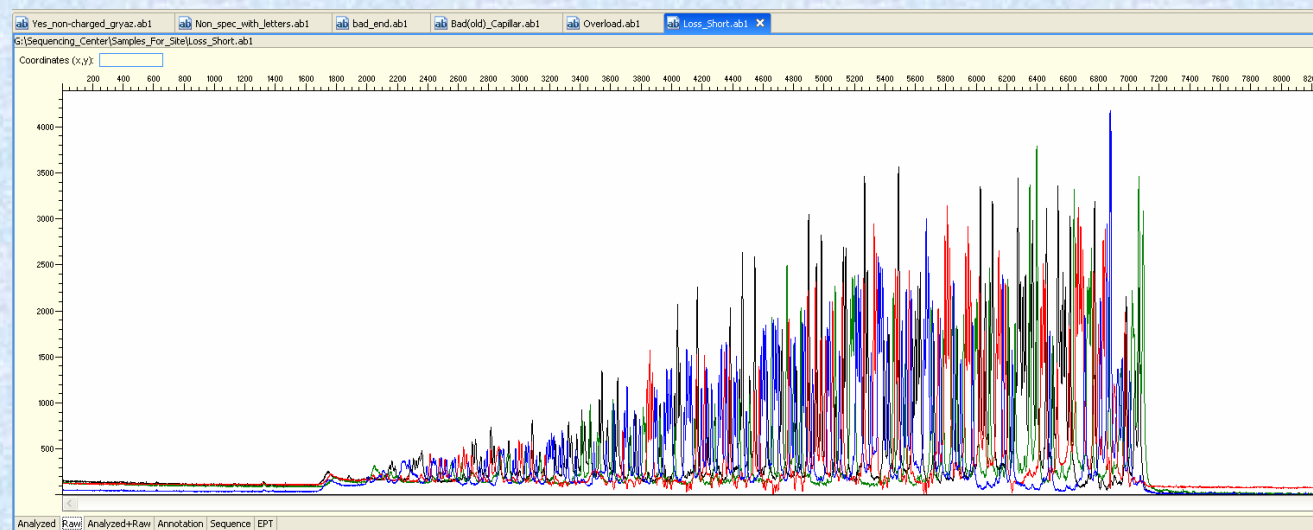
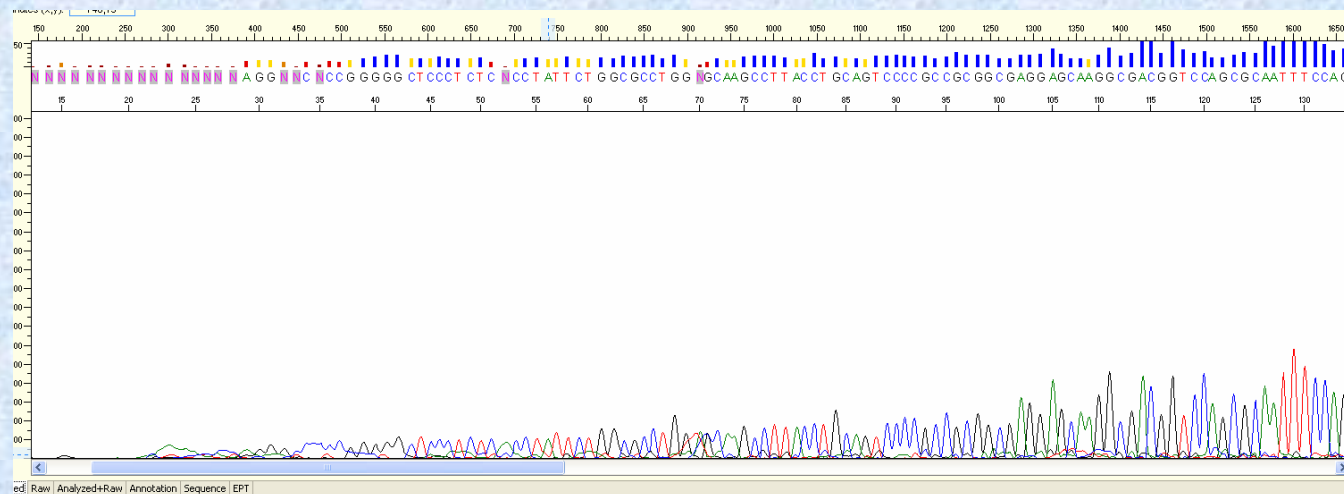


Хороший праймер в ПЦР

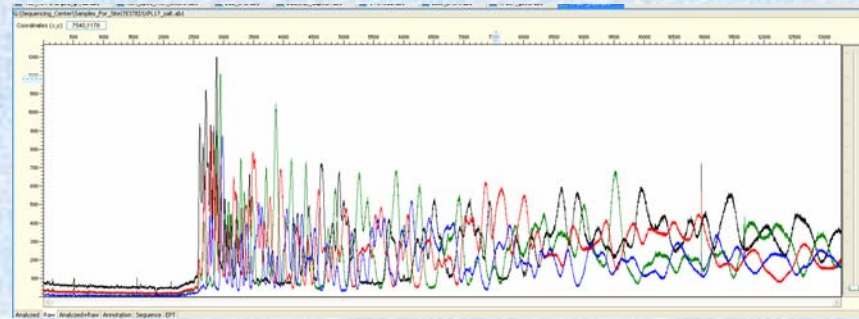
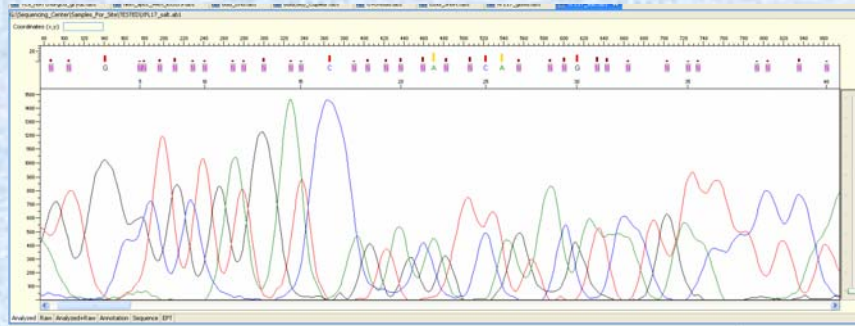


Плохой праймер в ПЦР

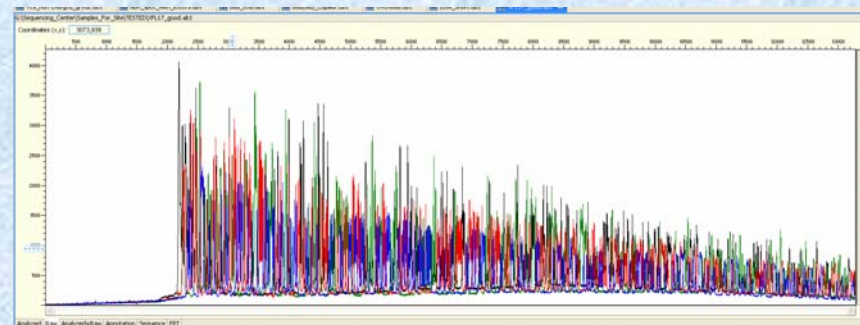
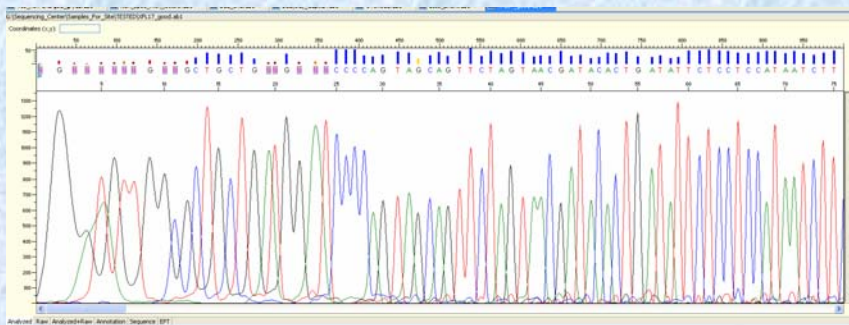
Потеря коротких фрагментов при очистке реакции



Проблемы при нанесении

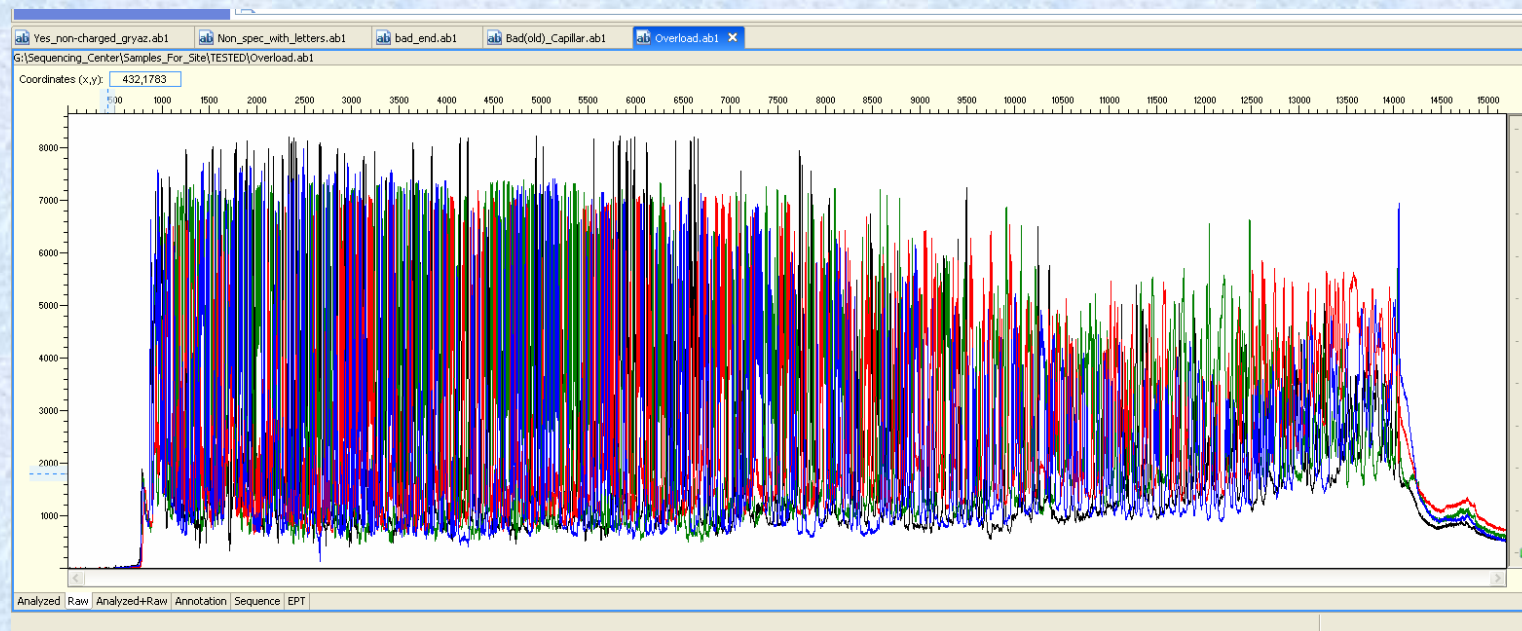


Соль в образце (относительно немного)

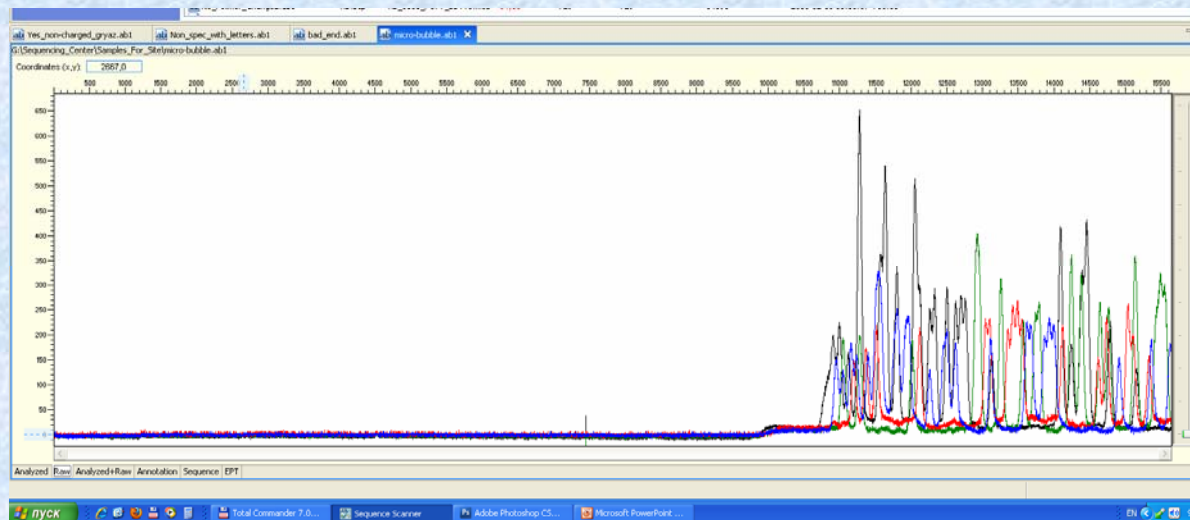


Переочистка гель-фильтрацией

Перенанесение

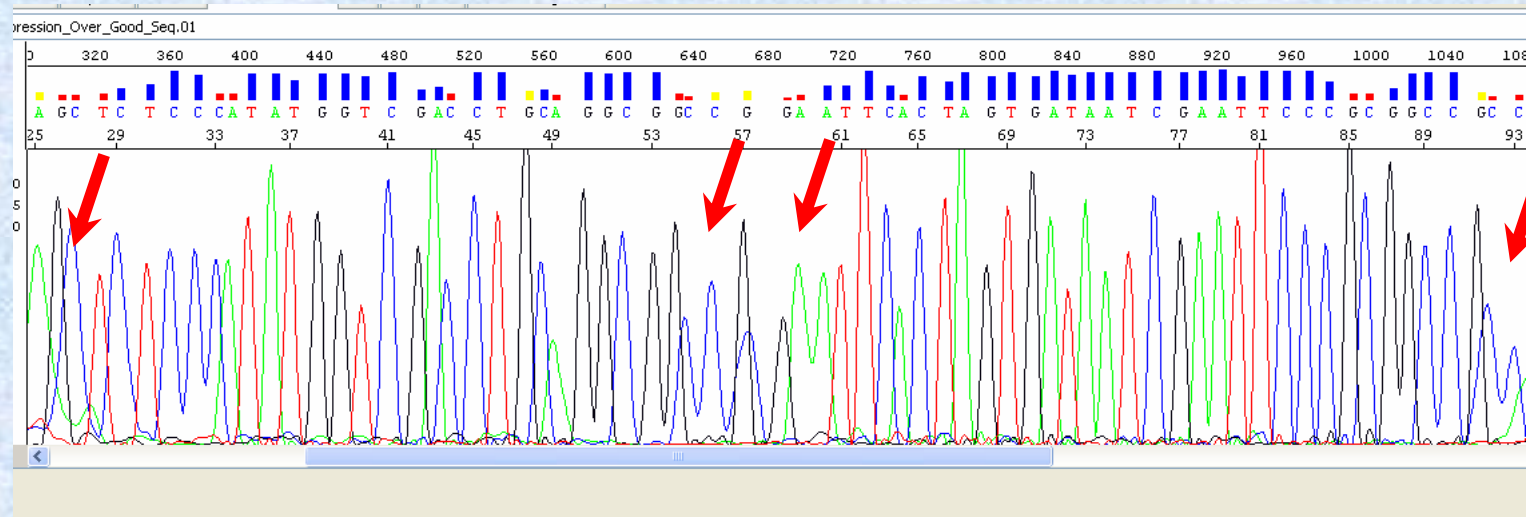
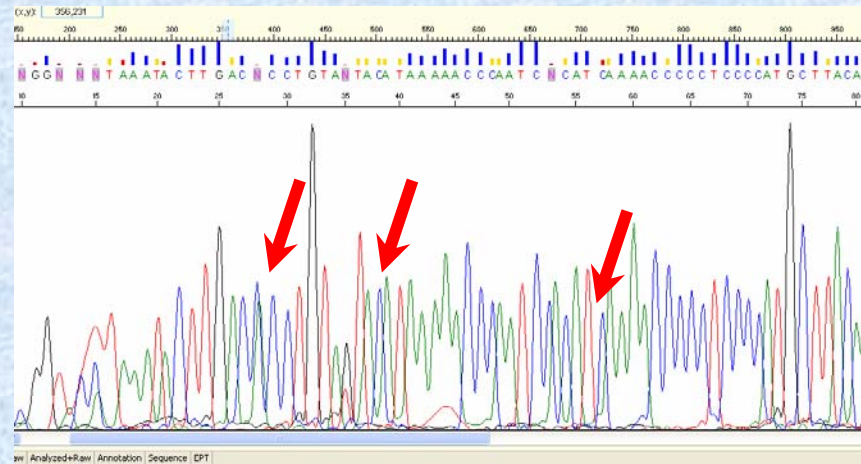


Погрешности работы прибора



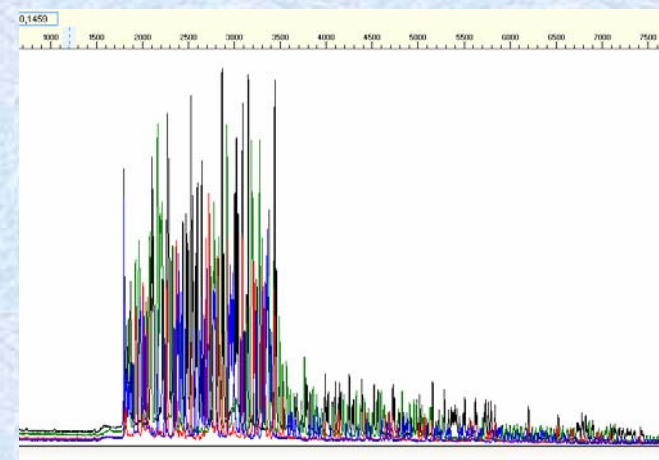
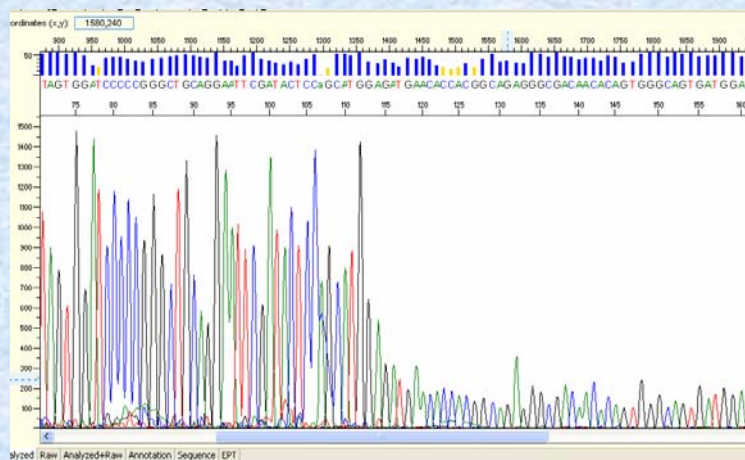
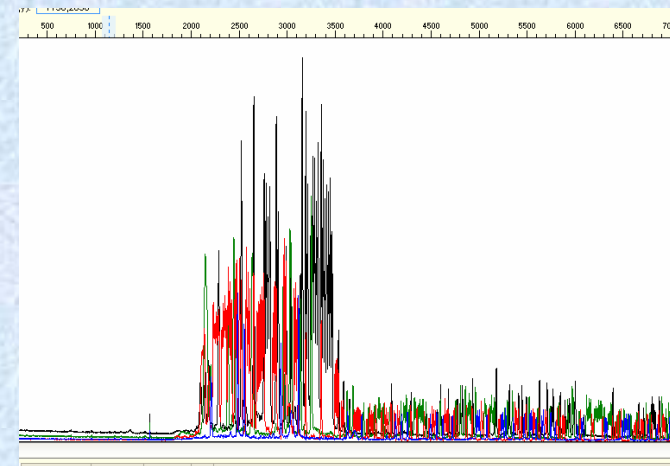
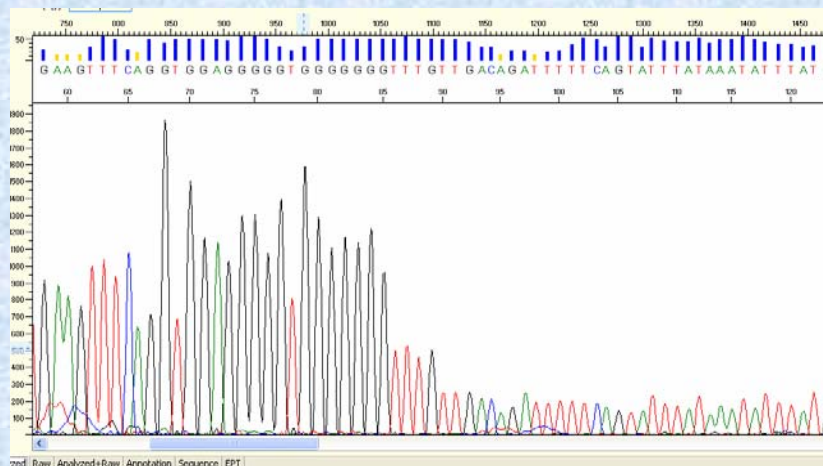
Микропузырёк в полимере внутри капилляра

Проблемы, создаваемые особенностями матрицы



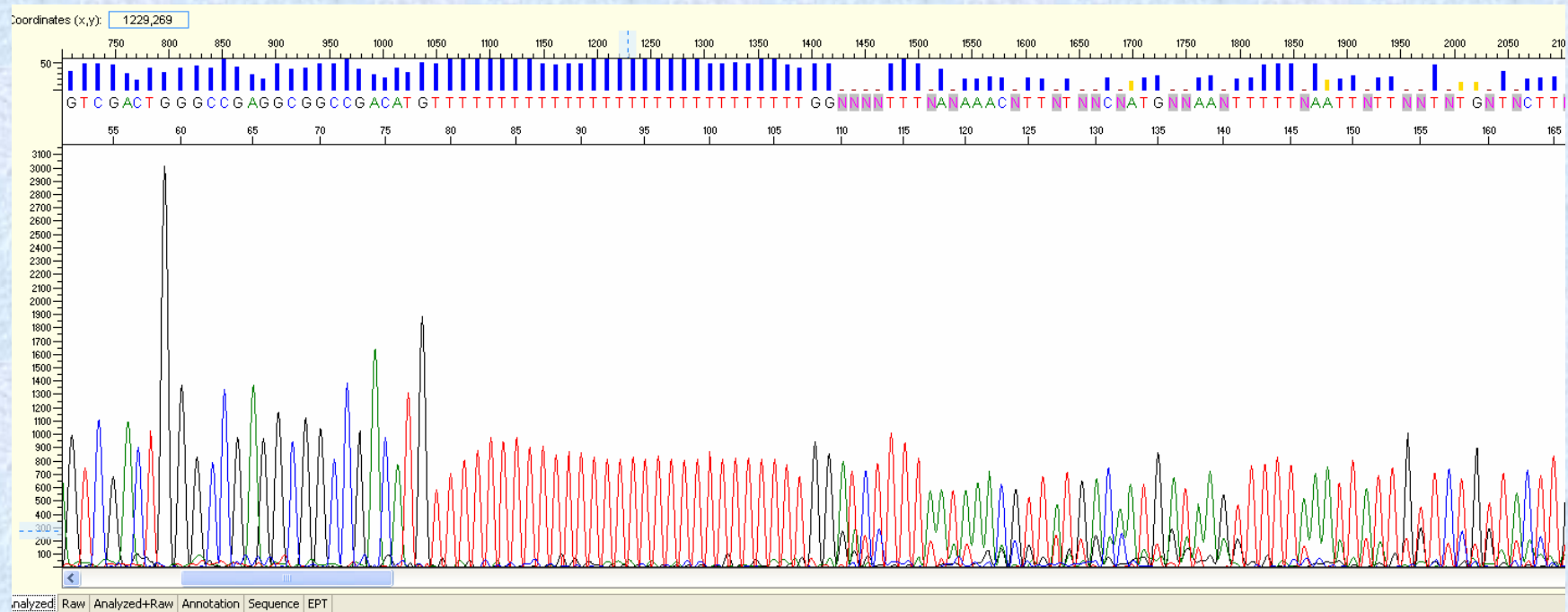
Компрессия – непропорциональное деление пиков в начале последовательности

Проблемы, создаваемые особенностями матрицы



GA-stop – терминация работы секвеназы

«Проскальзывание» полимеразы



[illegible]

Тарифы за секвенирование в МЦС

Оплата осуществляется два раза в год весна/осень

Две составляющие: 1) оплата за разгонку для ИЦиГ:

Более 500 образцов	От 100 до 500 образцов	Менее 100 образцов
68 руб	82 руб	116 руб

2) оплата за реактив для секвенирования BigDye - 55 руб/мкл

Удачных вам сиквенсов!