



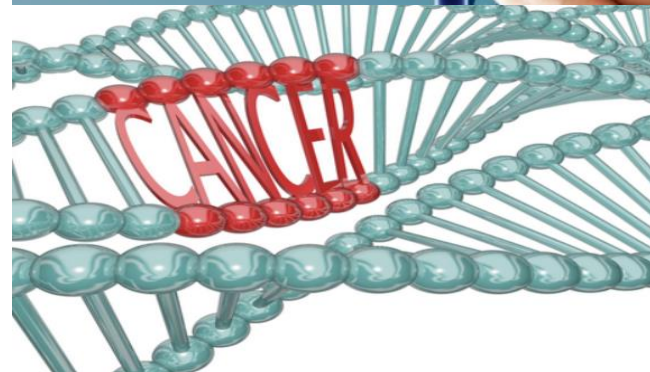
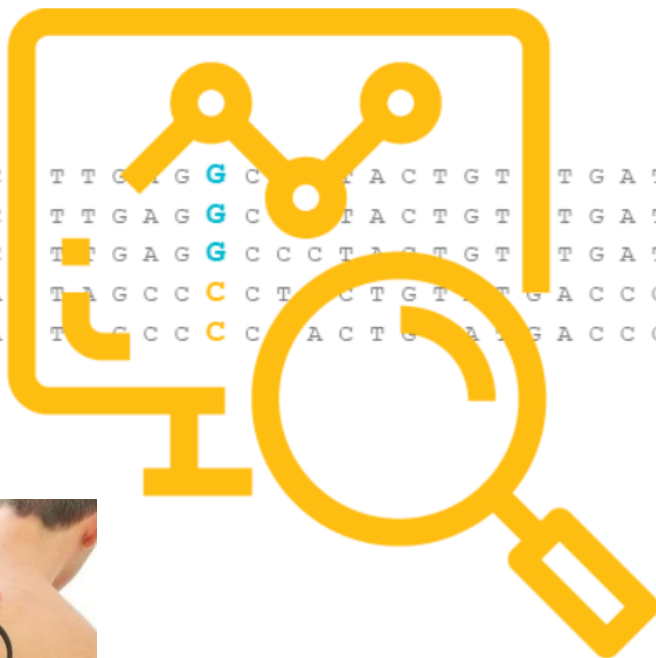
# **Одномолекулярное ДНК секвенирование в реальном времени. Основные принципы, возможности и ограничения**

Выполнили:  
Смирнов Алексей  
Савко Полина  
Биньяо Ли

# Применение технологий секвенирования



A G G T T G C T T G A G G C T A C T G T T G A T C C T T T  
A G G T T G C T T G A G G C T A C T G T T G A T C C T T T  
A G G T T G C T T G A G G C C C T A C T G T T G A T C C T T T  
A G C T A G A T A G C C C C T C T G T T G A C C C T A C T G  
A G C T A G A T C C C C C A C T C A G A C C C T A C T G

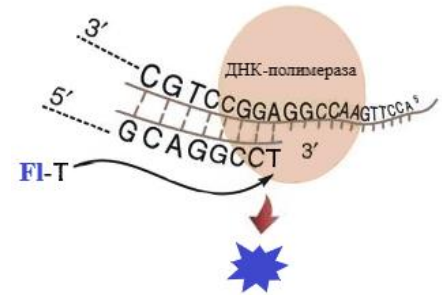
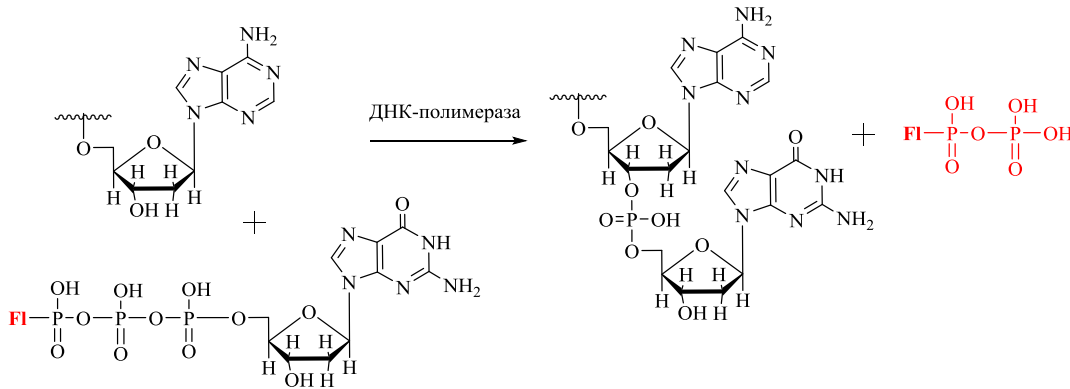


# SMRT-секвенирование. Суть метода

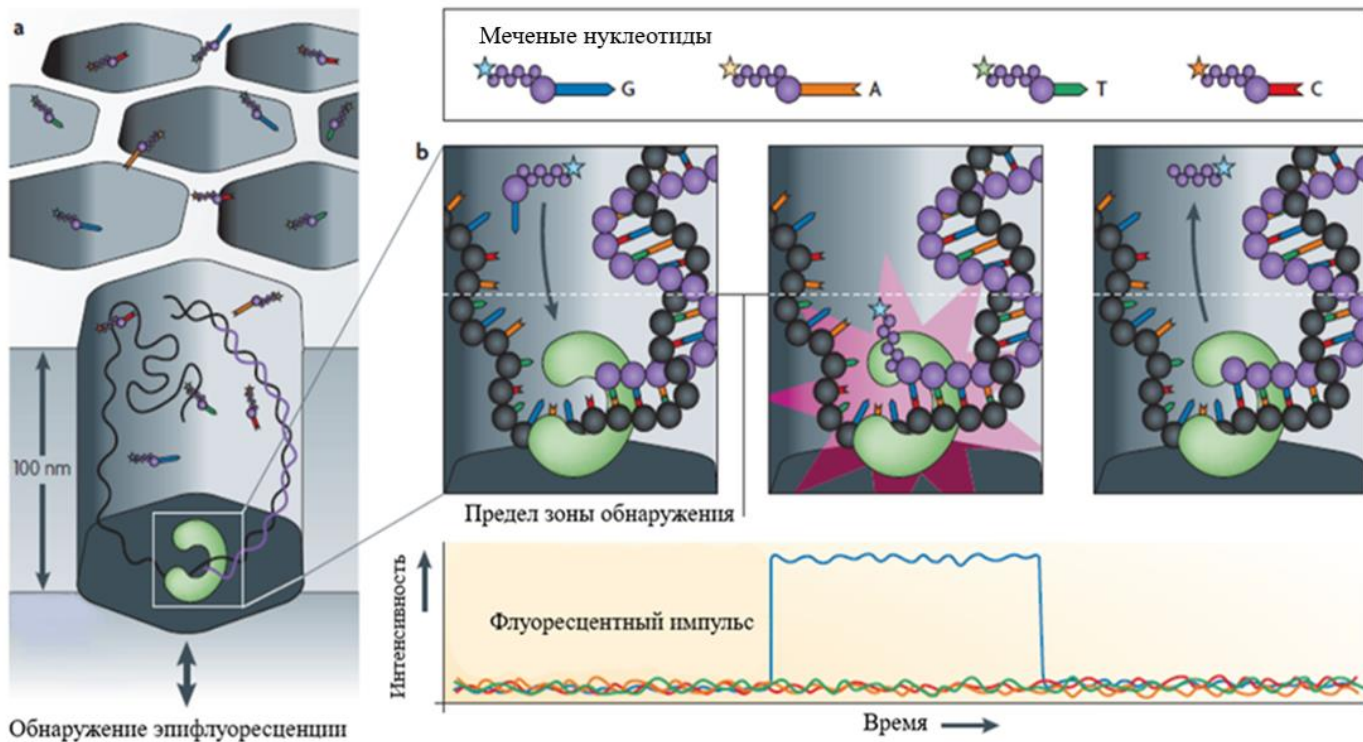
Это метод секвенирования ДНК нового поколения, разработанный компанией Pacific Biosciences



Метод состоит в определении последовательности ДНК за счёт наблюдения за работой единичной молекулы ДНК-полимеразы в реальном времени



# SMRT-секвенирование. Суть метода

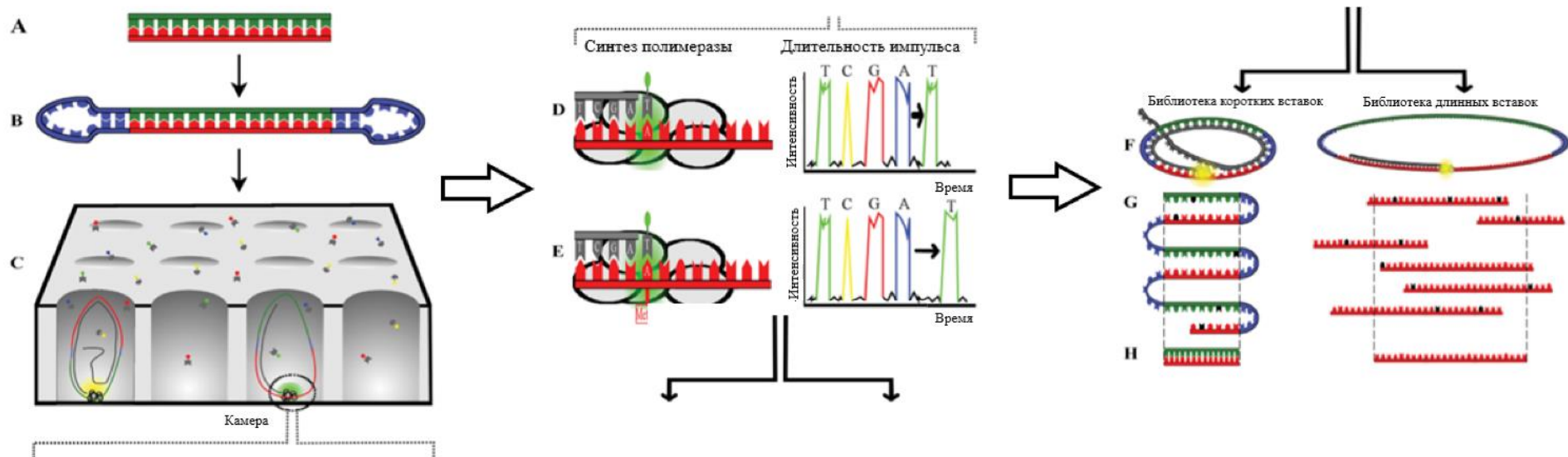


# SMRT-секвенирование. Суть метода



SMRT™ Cell

# Обзор технологии SMRT-секвенирования

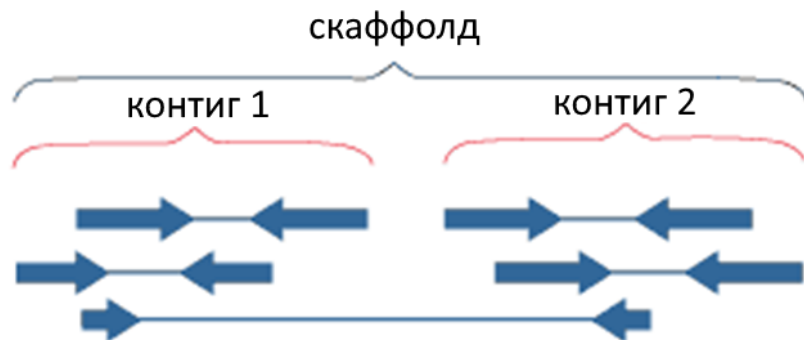


# Нахождение консенсусной последовательности



**Контиг** – набор перекрывающихся сегментов

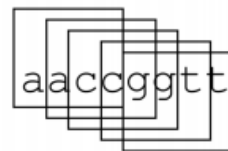
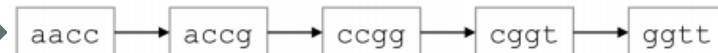
**Консенсусная область** – совокупность контигов



- ↔ фрагмент
- известная часть фрагмента
- неизвестная часть, длина примерно известна



aaccgg  
ccggtt



# Комбинация методов второго и третьего поколения

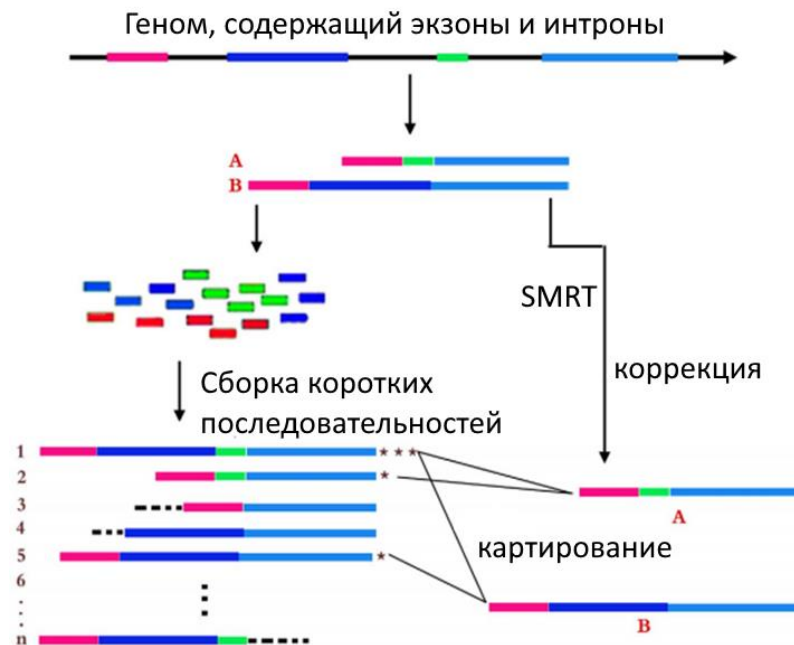
## Поколения технологий секвенирования

**I** – стадии проходят вручную, фрагменты < 0.1 kb

**II** – стадии проходят автоматически, фрагменты < 1 kb

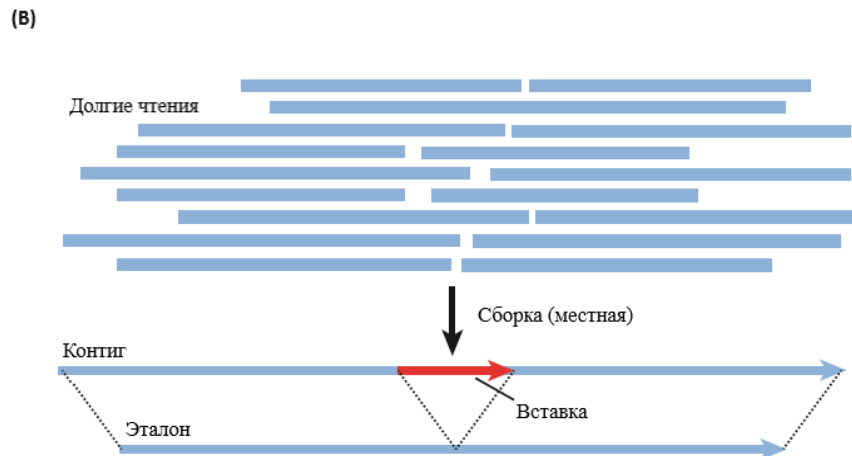
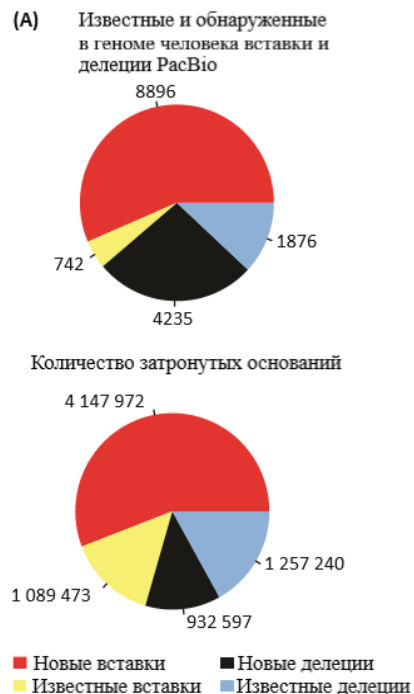
**III** – SMRT, фрагменты 10-16 kb, скорость ограничена работой полимеразы

Паттерны сплайсинга и экспрессии генов могут быть эффективно определены с помощью этого подхода по отдельным РНК, даже в отсутствие доступного эталонного генома.

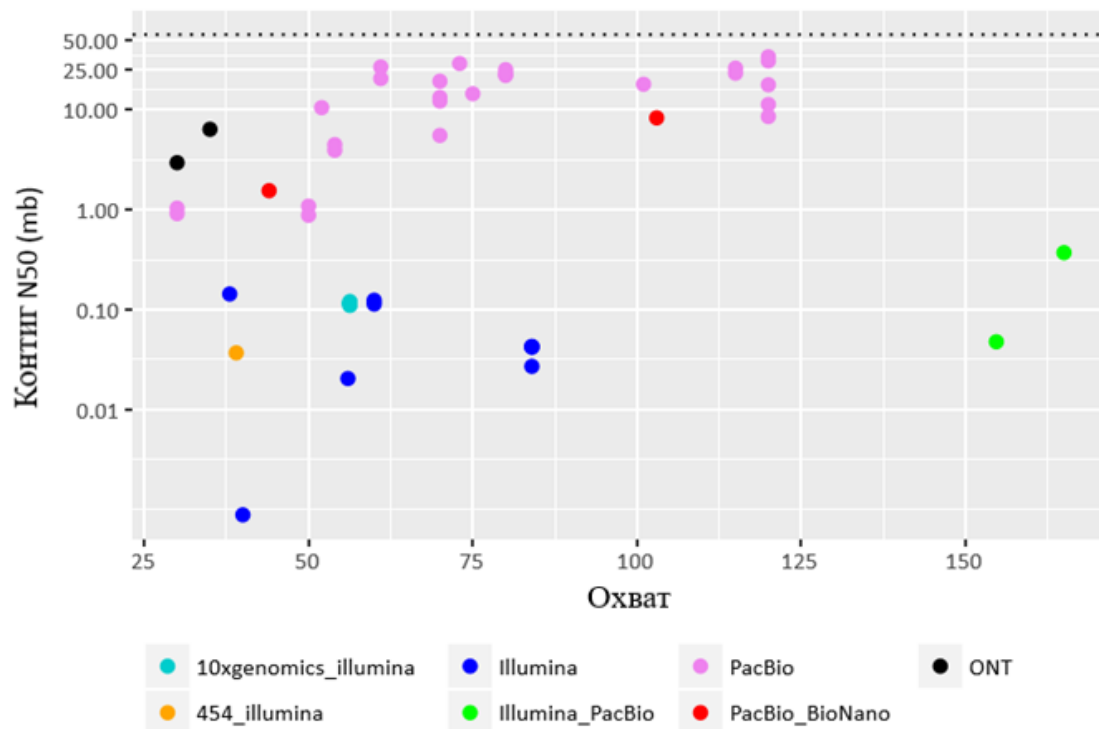




# Применение SMRT-секвенирования



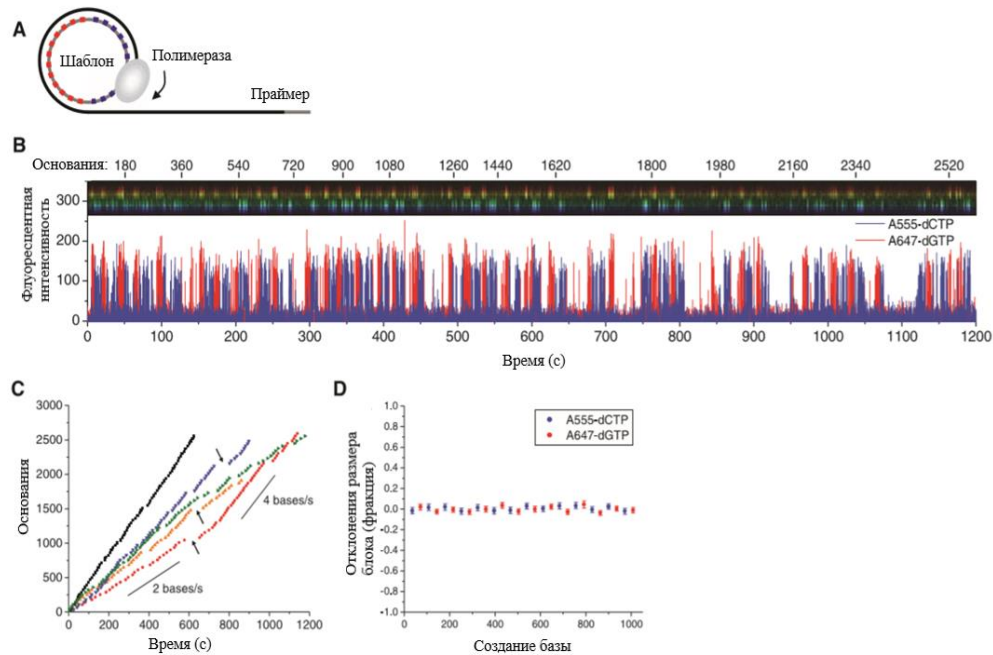
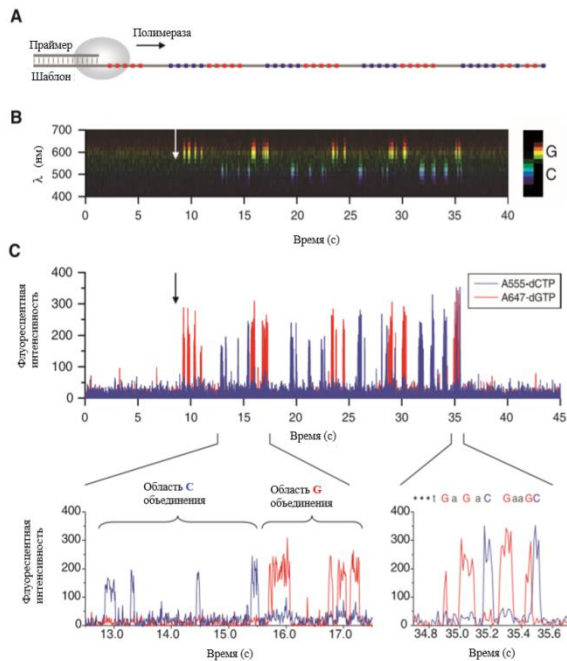
# Применение SMRT-секвенирования



# Применение SMRT-секвенирования

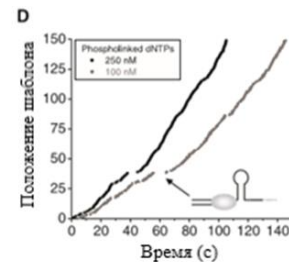
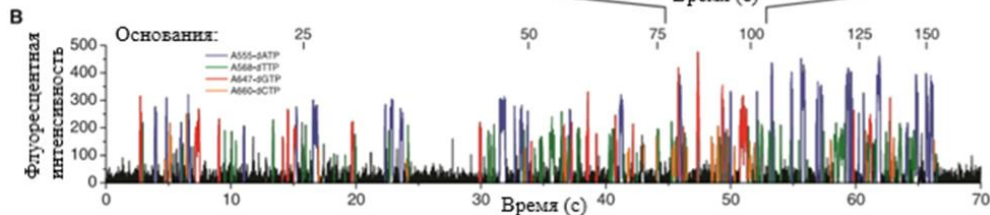
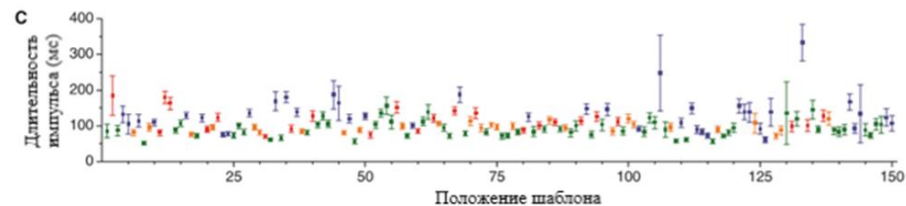
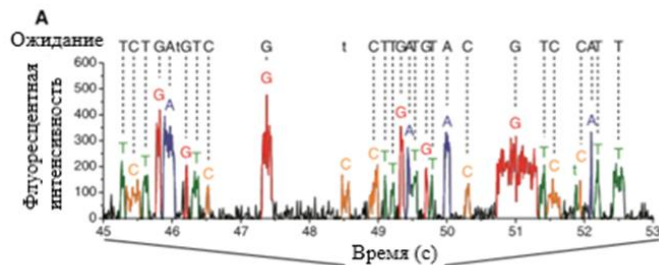


SMRT-секвенирование с использованием ДНК-полимеразы, выполняющей непрерывный матрично-направленный синтез с использованием четырёх флуоресцентноразличимых меченых дезоксирибонуклеозидтрифосфатов (dNTP)

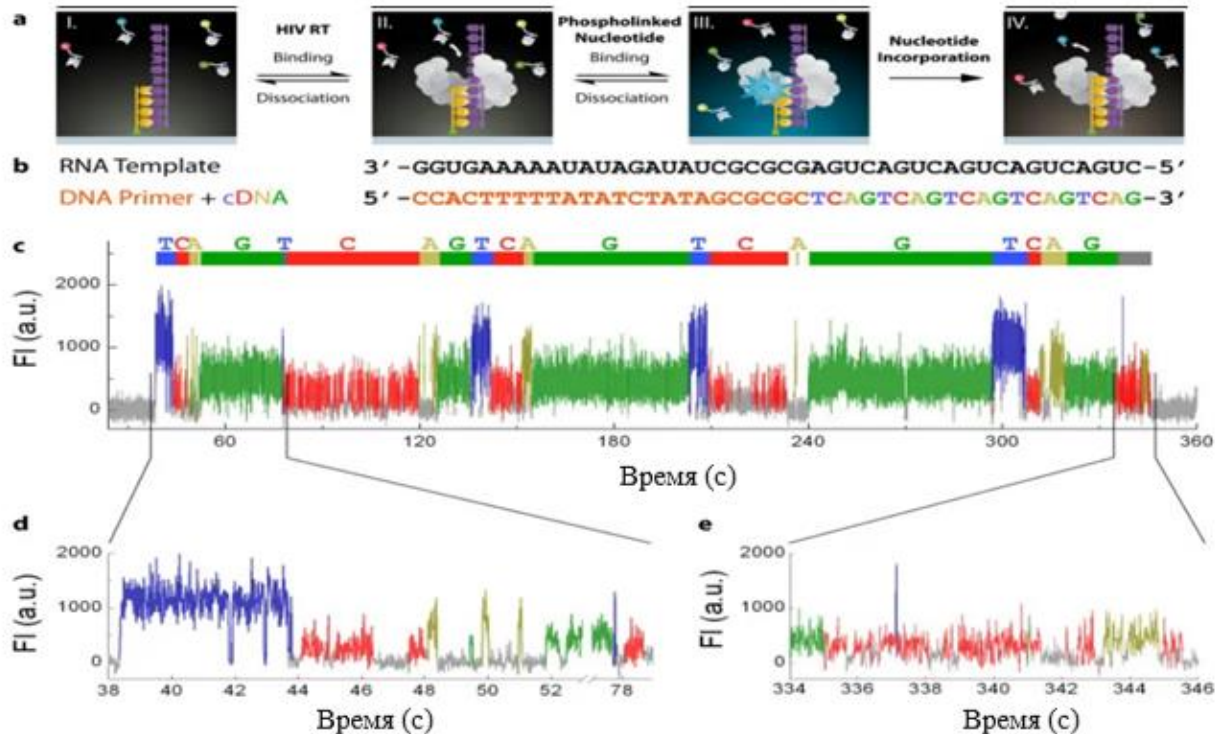


# Применение SMRT-секвенирования

SMRT-секвенирование с использованием ДНК-полимеразы, выполняющей непрерывный матрично-направленный синтез с использованием четырёх флуоресцентно-различимых меченых дезоксирибонуклеозидтрифосфатов (dNTP)



# Применение SMRT-секвенирования

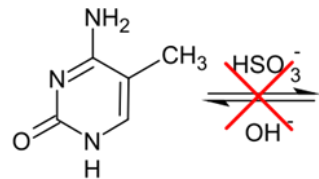
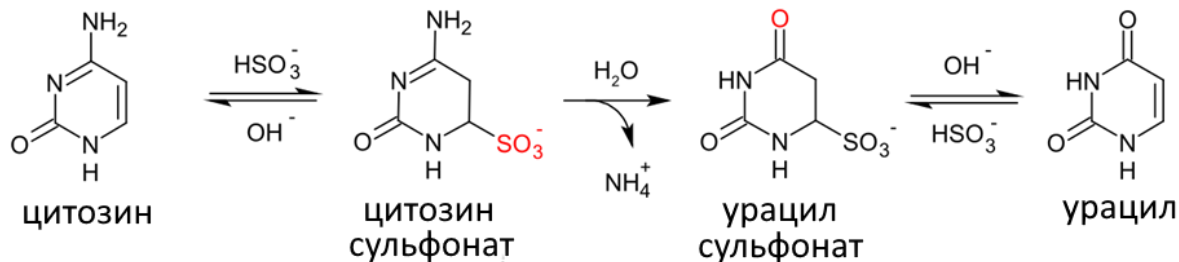


# Применение SMRT-секвенирования



## Секвенирование метилированной и гидроксиметилированной ДНК

### Вводная: Традиционное бисульфитное секвенирование



5-метилцитозин

- Бисульфит действует на ДНК, превращая цитозин в урацил
- Если цитозин метилирован, то он не подвергается превращению

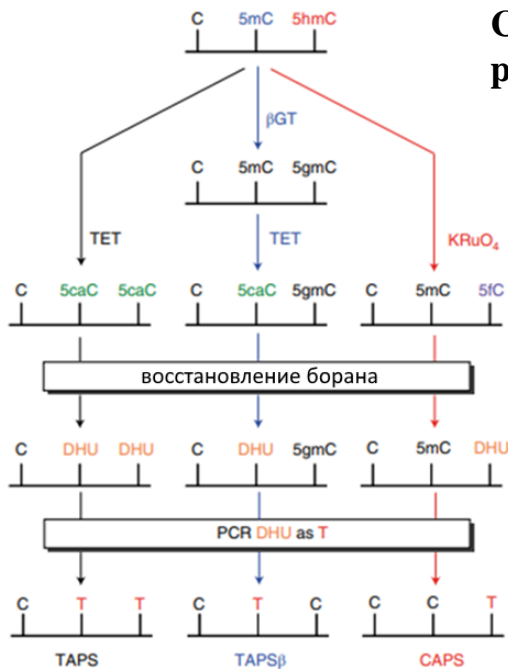
### Недостатки:

1. Нужны условия поддержания ДНК в денатурированном состоянии
2. Дегградация ДНК
3. Нельзя различить 5-гидроксиметилцитозин и цитозин

# Применение SMRT-секвенирования

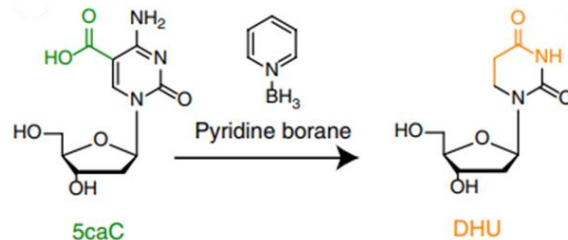


## Секвенирование метилированной и гидроксиметилированной ДНК



## Секвенирование пиридин-бораном с помощью TET (TAPS – TET-assisted pyridine-borane sequencing)

1. Энзим TET окисляет 5mC и 5hmC до 5caC
2. Пиридинборан восстанавливает 5caC до DHU



3. Полимераза распознает DHU как тимин (5mC/5hmC-T) при ПЦР, SMRT

Можно различить 5-гидроксиметилцитозин и цитозин

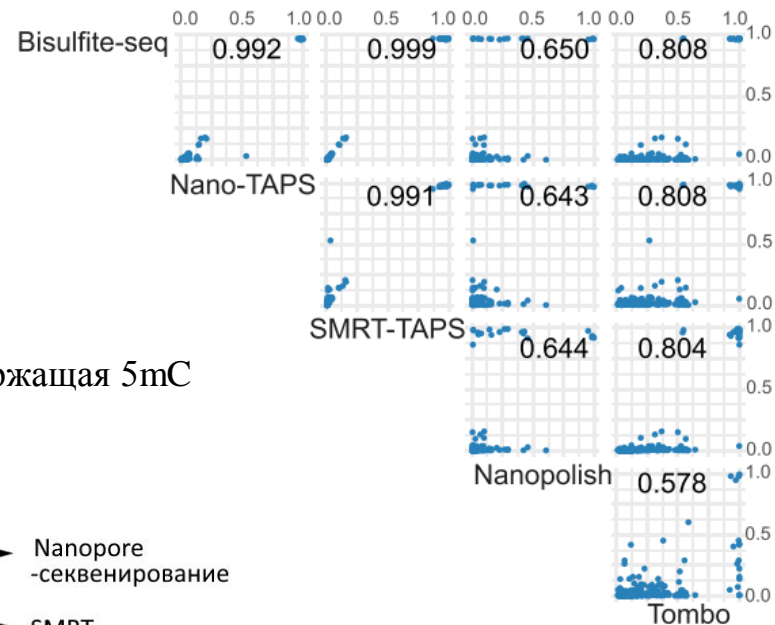
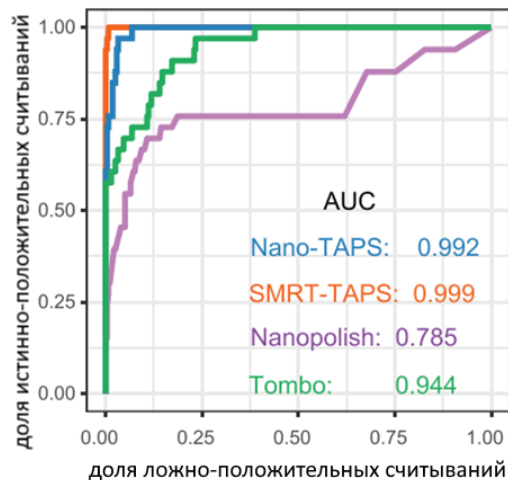
Можно различить метилцитозин с помощью β-глюкозилтрансферазы или перрутената калия

TAPS сохраняет молекулы > 10 т.п.н. и хорошо подходит для SMRT.

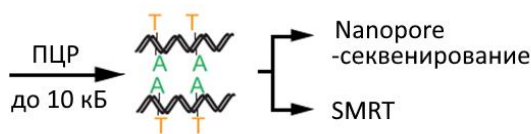
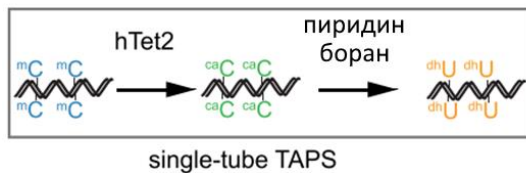
# Применение SMRT-секвенирования



## Секвенирование метилированной и гидроксиметилированной ДНК



**Модель:**  
4 кбр ДНК, содержащая 5mC





# Заключение



## Преимущества:

- Возможность получать очень длинные чтения
- Метод работает без предварительной амплификации исследуемой ДНК посредством ПЦР
- Высокая скорость секвенирования
- Для метода характерны высокая чувствительность и специфичность
- Возможность секвенирования с высокой точностью

## Недостатки:

- Высокая стоимость прибора — 600000\$
- Высокий уровень ошибок
- Возможно случайное присоединение лишних полимераз ко дну ячейки



1. Ameur, A., Kloosterman, W. P., & Hestand, M. S. (2018). Single-Molecule Sequencing: Towards Clinical Applications. Trends in Biotechnology. doi:10.1016/j.tibtech.2018.07.013. **IF** 2.37
2. Ardui, S., Ameur, A., Vermeesch, J. R., & Hestand, M. S. (2018). *Single molecule real-time (SMRT) sequencing comes of age: applications and utilities for medical diagnostics.* Nucleic Acids Research, 46(5), 2159–2168. doi:10.1093/nar/gky066. **IF** 7.62
3. Eid, J., Fehr, A., Gray, J., Luong, K., Lyle, J., Otto, G., ... Bettman, B. (2009). *Real-Time DNA Sequencing from Single Polymerase Molecules.* Science, 323(5910), 133–138. doi:10.1126/science.1162986. **IF** 23.6
4. Miller, J. R., Koren, S., & Sutton, G. (2010). *Assembly algorithms for next-generation sequencing data.* Genomics, 95(6), 315–327. doi:10.1016/j.ygeno.2010.03.001. **IF** 3.160
5. Ning, G., Cheng, X., Luo, P., Liang, F., Wang, Z., Yu, G. (2017) *Hybrid sequencing and map finding (HySeMaFi): optional strategies for extensively deciphering gene splicing and expression in organisms without reference genome.* Scientific Reports, 7(1). doi:10.1038/srep43793. **IF** 5.525
6. Vilfan, I.D., Tsai, Y., Clark, T.A. et al. Analysis of RNA base modification and structural rearrangement by single-molecule real-time detection of reverse transcription. J Nanobiotechnol 11, 8 (2013). doi.org/10.1186/1477-3155-11-8. **IF** 5.345
7. Fraga, M. F., & Esteller, M. (2002). *DNA Methylation: A Profile of Methods and Applications.* BioTechniques, 33(3), 632–649. doi:10.2144/02333rv01. **IF** 2.098
8. Liu Y., Cheng J., Siejka-Zielińska P., Weldon C., Roberts H., Lopopolo M., Magri A., D'Arienzo V., Harris J.M., McKeating J.A. Song C.-X. *Accurate targeted long-read DNA methylation and hydroxymethylation sequencing with TAPS* // Genome Biol. BioMed Central, 2020. T. 21, № 1. C. 54. **IF** 14.028

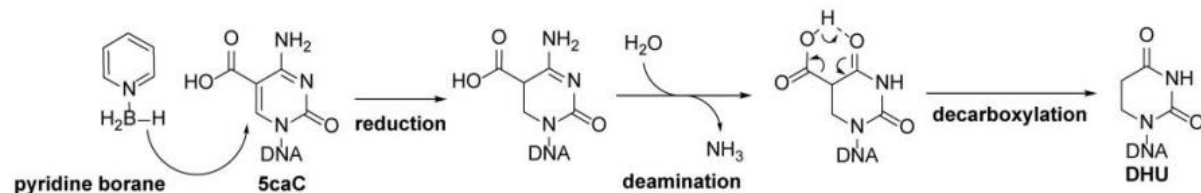


**СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!**

# Приложение



## Механизм восстановления 5caC пиридинбораном



1. Энзим TET окисляет 5mC и 5hmC до 5caC
2. Пиридинборан восстанавливает 5caC до DHU
3. Полимераза распознает DHU как тимин (5mC/5hmC-T)

