

Санкт-Петербургский
государственный
университет
www.spbu.ru

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

Выполнили:
Смирнов Алексей
Савко Полина
Биньяо Ли

spbu.ru

Добрый день! Представляем вам доклад на тему: «Одномолекулярное ДНК секвенирование в реальном времени. Основные принципы, возможности и ограничения».

Применение технологий секвенирования



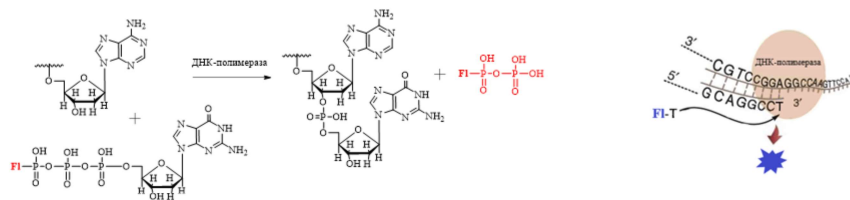
Технологии секвенирования имеют широкое применение от пренатальной диагностики, скрининга новорождённых до диагностики редких заболеваний, наследственных форм рака, фармакогенетического тестирования и тестирования предрасположенности к множеству заболеваний. Мы расскажем об одной из этих технологий, а именно одномолекулярном секвенировании в реальном времени (single molecule real time (SMRT) sequencing).

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

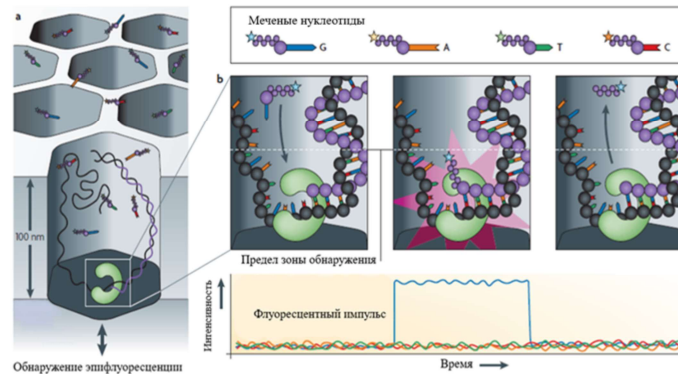


3

spbu.ru

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. В ходе процесса ДНК-полимераза достраивает комплементарную цепь одноцепочечной ДНК, используя нуклеотиды, меченные различными флуоресцентными метками, регистрация которых позволяет понять, какой нуклеотид ДНК-полимераза встраивает в настоящий момент. Флуоресцентные метки пришиты к терминальной фосфатной группе нуклеотидов. Такая метка меньше влияет на работу ДНК-полимеразы. В процессе присоединения нуклеотида к растущей цепи ДНК метка отщепляется ДНК-полимеразой вместе с пирофосфатом. В результате этого флуорофор может диффундировать из наблюдаемого объёма и больше не влиять на регистрируемый сигнал, а нуклеотид без «довесков» встраивается в цепь ДНК.

SMRT-секвенирование. Суть метода



4

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

spbu.ru

В данном методе используют так называемые SMRT-ячейки, содержащие порядка 150000 ZMW-ячеек (zero-mode waveguide cells), которые представляют собой углубления диаметром несколько десятков нанометров в алюминиевой плёнке, напылённой на кремниевую подложку. Ко дну ZMW-ячеек прикреплена единичная молекула ДНК-полимеразы. Сквозь дно в ZMW-ячейку подаётся свет. Особенность конструкции ZMW-ячейки не даёт распространяться световой волне и оставляет освещённым только объём порядка 20 пиктолитров около дна ячейки. Это позволяет наблюдать флуоресценцию единичной флуоресцентной метки, пришитой к нуклеотиду, в данный момент встраиваемому ДНК-полимеразой. Соответственно, к четырём типам нуклеотидов пришиты разные флуоресцентные метки, что позволяет различать их. Таким образом, при полимеризации цепи ДНК можно получить зависимость интенсивности флуоресценции от времени, из графика которой по пикам разного спектра определяется последовательность ДНК.

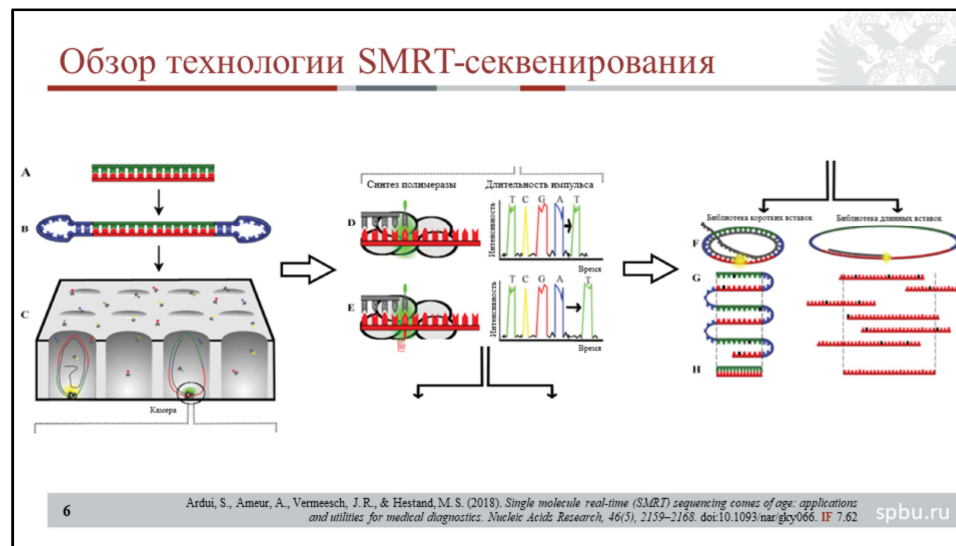
SMRT-секвенирование. Суть метода



5

spbu.ru

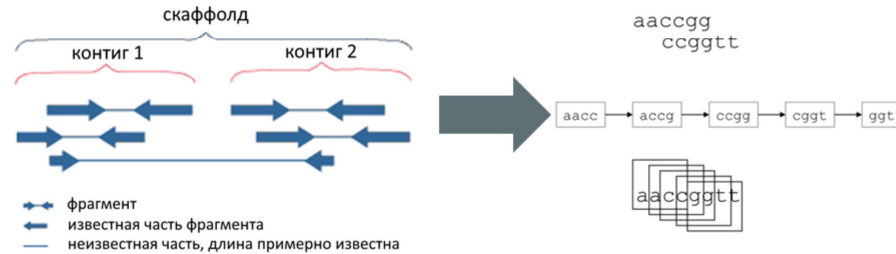
На слайде представлено видео, которое позволит наглядно ознакомиться с сущностью данного метода.



Теперь рассмотрим технологию данного метода. Итак, секвенирование начинается с подготовки «библиотеки» из двухцепочечной ДНК (А), к которой пришиваются адаптеры (В). Адаптер состоит из двух олигонуклеотидов, частично комплементарных друг другу. Это позволяет ДНК стать одноцепочечной круговой матрицей. Это означает, что ДНК может быть секвенирована непрерывно. Затем эта ДНК загружается в SMRT-ячейки, содержащие ZMW-ячейки. Молекулы ДНК в библиотеке будут перемещены на дно ZMW-ячеек, где ДНК-полимераза образует двухцепочечную ДНК с использованием флуоресцентно меченных нуклеотидов (С). При этом может регистрироваться не только флуоресцентный цвет, но и время между включением нуклеотидов в цепь, которое называется межпульсным (D, правая панель). Когда ДНК-полимераза встречает модифицированные, например, метилированные нуклеотиды, происходит задержка во времени (E, правая панель) по сравнению с неметилированными нуклеотидами (D, правая панель). Каждый проход исходной одноцепочечной ДНК называется субчитанием, которое может быть объединено в одну высокоточную консенсусную последовательность, называемую круговой консенсусной последовательностью (F-H, левая панель). В SMRT-секвенировании длинные вставки, как правило, имеют только один проход и, следовательно, генерируют линейную последовательность с частотой ошибок за один проход (черные нуклеотиды) (F-G, правая панель). После этого перекрывающиеся отдельные проходы могут быть объединены в одну согласованную последовательность высокого качества (H, правая панель).

Нахождение консенсусной последовательности

Контиг – набор перекрывающихся сегментов
Консенсусная область – совокупность контигов



7

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

spbu.ru

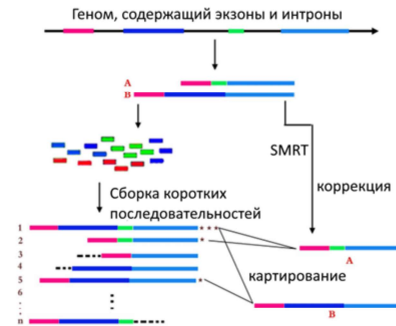
Также следует отметить, что перед секвенированием ДНК расщепляется на сегменты. Сегменты секвенируются различными методами, приводя к набору еще меньших сегментов. Набор сегментов, имеющий перекрывающуюся область образует контиг. Совокупность контигов образует скаффолд – общую картируемую последовательность. Картирование – непростая задача, решаемая методами комбинаторики. Справа представлен пример такой расшифровки: после расщепления скаффолда имеем два фрагмента по 6 нуклеотидов. После секвенирования этих фрагментов получили 5 фрагментов по 4 нуклеотида. С помощью парного перекрывания восстановили предполагаемый скаффолд из 8-ми фрагментов. Полученная последовательность называется консенсусной.

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.



8

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

spbu.ru

В 2017 был предложен метод гибридного секвенирования и картографирования (HySeMaFi), позволяющий на основе комбинации некоторого метода второго поколения и третьего – SMRT, восстанавливать точный геном.

1. (A, B) изоформы РНК генерируются в каких-то живых тканях.
2. Затем используются две стратегии секвенирования.

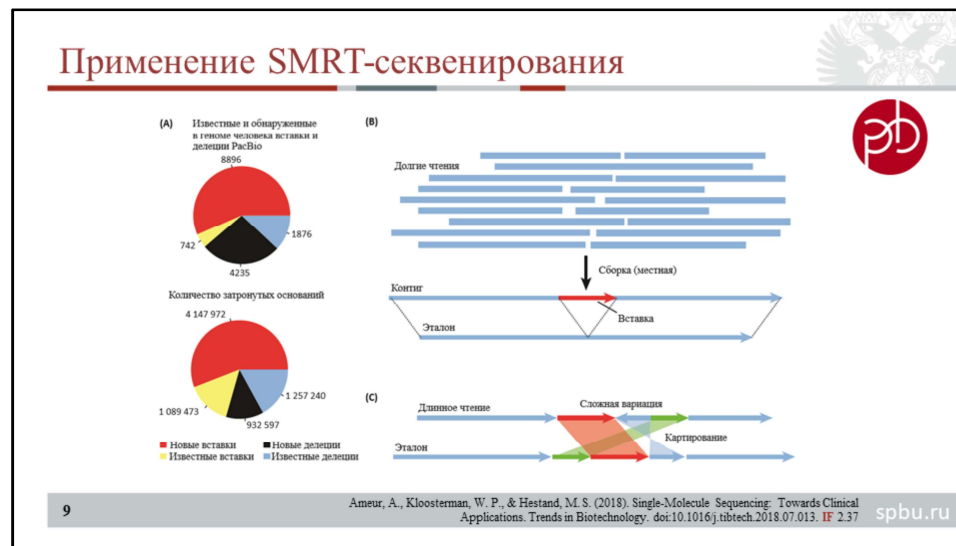
Метод третьего поколения приводит только к двум специфичным для ткани реальным молекулам.

Методы второго поколения приводят к множеству различных комбинаций фрагментов.

Самая длинная молекула (т.е. включающая в себя все экзоны гена) была собрана путем объединения всех других реальных, а также ложных молекул, которые были созданы в конкретном типе ткани.

После сопоставления (маппинга) молекул, полученных двумя разными методами и восстанавливается начальная последовательность экзонов ДНК.

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



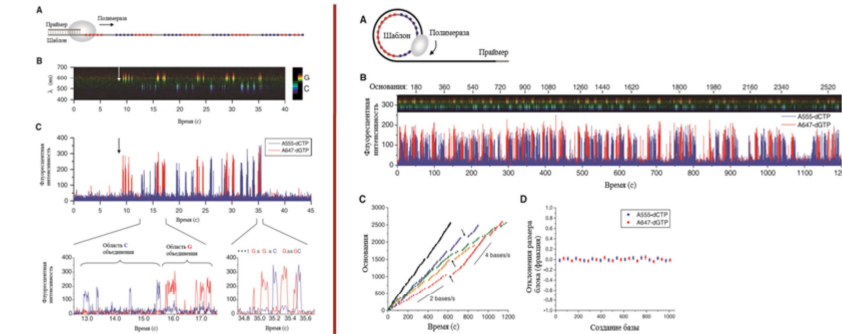
В последние несколько лет платформы для одномолекулярного секвенирования, например, Pacific Biosciences, предлагают исключительно длинные чтения, которые обеспечивают прямое секвенирование по областям генома, недоступным или трудноанализируемым с помощью коротких чтений. Эти платформы позволяют характеризовать структурные изменения и обнаруживать эпигенетические метки в нативной ДНК. Длинные чтения могут включать в себя специфические области, которые будут упорядочены в этих чтениях. Это невозможно с короткими чтениями. Возможны вариации в тандемных повторах, что может быть причиной различных заболеваний. Для других методов трудно решение частоповторяемых фрагментов, а также определение метилированных составляющих. Данный метод способен позволить определить по группе тандемных повторов вызываемые ими заболевания.

Ключевым преимуществом длинных считываний является возможность непосредственного обнаружения структурных переходов, точек разрыва. Секвенирование с длинным считыванием способно позволить выявлять патогенные структурные вариации. Длительное считывание способствует выявлению генов, лежащих в основе генетических заболеваний человека.

На изображении представлено обнаружение структурных вариаций с помощью последовательного считывания: под буквой **A** представлены круговые диаграммы, показывающие количество новых вставок и делеций PacBio, обнаруженных в геноме человека, по сравнению с известными вариантами, а также количество оснований, затронутых этими вариантами. Под буквой **B** видно схематическое собрание длинных чтений для выявления (связанных с болезнью) структурных изменений. Под буквой **C** представлено использование прямого сопоставления длинных чтений с эталонным геномом для разрешения сложных структурных вариаций.

Применение SMRT-секвенирования

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



11

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

spbu.ru

На слайде представлен следующий пример применения SMRT-секвенирования.

Первое изображение (слева):

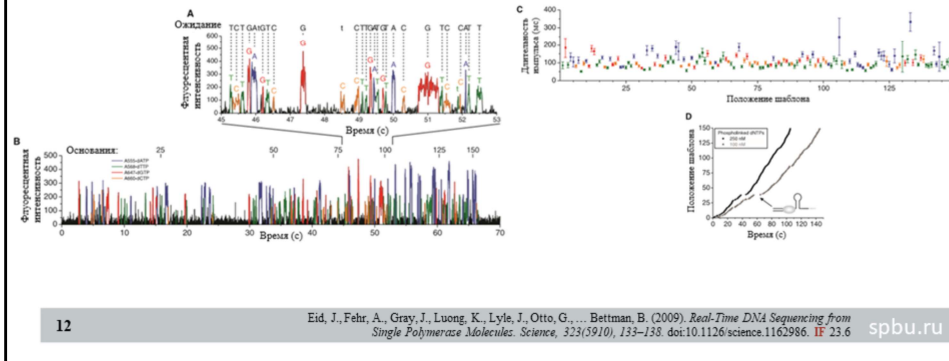
Чтобы проиллюстрировать авторский принцип подхода к секвенированию ДНК, была использована синтетическая линейная одноцепочечная ДНК-матрица с двухосновным паттерном искусственной последовательности (А). Чередующиеся участки матрицы, в которых пропущены цитозин или гуанин, чтобы обеспечить включение чередующихся блоков двух связанных с фосфолином нуклеотидов (A555-dCTP и A647-dGTP). Реакции инициировали добавлением каталитически важных ионов металлов. Спектр флуоресцентных изображений с временным разрешением представлен для примера под В. Эти данные были уменьшены с помощью взвешенного суммирования двух значений, представляющих скорость излучения каждого из двух фосфорилированных dNTP как функцию времени (С). Чтение содержит импульсы с ожидаемым рисунком: чередующиеся блоки импульсов одинакового цвета, соответствующие чередующимся блокам в шаблоне. Импульсная активность прекращалась после завершения всех 123 включений нуклеотидов, необходимых для достижения конца линейной матрицы.

Второе изображение (справа):

Чтобы исследовать потенциал этого метода для долговременного секвенирования ДНК, авторы выполнили аналогичный эксперимент с двумя последовательностями сигнатурных последовательностей с использованием одноцепочечного кольцевого ДНК-тэмплате с 72 основаниями (А). Шаблон был разработан таким образом, что цитозины присутствовали только на половине круга, а гуанины – на другой половине. ДНК-полимераза F29 является высокопроцессивной (> 70000 оснований). Репрезентативное чтение (В) показало ожидаемую непрерывную последовательность сигнатурных последовательностей чередующихся периодов импульсов A555-dCTP и A647dGTP. Импульсные характеристики были аналогичны характеристикам, описанным для рисунка слева, и оставались одинаковыми на протяжении всего чтения. Активность полимеризации ДНК длилась тысячи секунд, что позволило наблюдать несколько килобаз синтеза ДНК (верхняя ось В). Видны случайные паузы в полимеризационной активности ДНК. Общая длина синтезированной ДНК как функция времени (С) показывает периоды различных постоянных скоростей полимеризации во время этих длинных считываний. Были определены две характерные скорости полимеризации ~ 2 основания/с и ~ 4 основания/с, что указывает на существование различных долгоживущих полимеразных мод, которые время от времени и внезапно взаимопревращаются. Никакой пространственной корреляции в скорости полимеразы не наблюдалось. Характеристики импульсов, лежащие в основе этих двух состояний, были статистически идентичны. Среднее число импульсов соответствовало 1000 оснований (D). Следовательно, этот подход секвенирования поддерживает точность независимо от длины чтения.

Применение SMRT-секвенирования

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



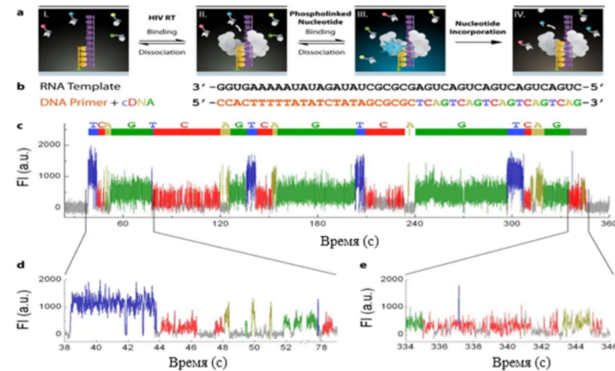
12

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

spbu.ru

Измерения, описанные выше, были расширены до четырёхцветного секвенирования ДНК. Все четыре нативных нуклеотида были полностью заменены следующим набором фосфолинкодированных dNTP: A555dATP, A568-dTTP, A647-dGTP и A660-dCTP. Два лазера были использованы для возбуждения четырех флуорофоров. Флуоресцентные импульсы были идентифицированы с помощью порога обнаружения на основе взвешенного по красителю суммирования. Базовым идентификаторам импульсов автоматически присваивались измеренные спектры по квадратным кривым, совпадающим с эталонными спектрами dNTP, связанными с четырьмя фосфатами. Чтение, извлечённое из измеренных импульсов, хорошо соответствовало основной последовательности зарождающейся нити ДНК, охватывающей всю длину линейного шаблона из 158 оснований (A и B). Из 158 общих оснований 131 были правильно идентифицированы автоматически, 27 ошибок состояли из 12 удалений, 8 вставок и 7 несовпадений. Ширину импульса и интервал импульсов показывали как функцию положения последовательности на C и D, соответственно. Средняя длительность импульса обычно составляла от 200 до 700 мс, за исключением нескольких случаев с гораздо более высокими значениями. Эти паузы соответствуют областям с прогнозируемой стабильной вторичной структурой в шаблоне.

Применение SMRT-секвенирования



13

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

spbu.ru

Идём дальше. Методы секвенирования РНК основаны на синтезе комплементарной ДНК (кДНК) с последующим секвенированием кДНК. Таким образом, информация о модификациях РНК теряется в процессе синтеза кДНК. Авторы рассматриваемой статьи описывали применение в этом процессе технологии SMRT. Этот метод получает информацию непосредственно из матрицы РНК.

- (a) РНК-матрица (пурпурная) гибридизуется с биотинилированным праймером ДНК (оранжевая) и иммобилизуется на дне ZMW-ячейки (I). Обратная транскриптаза (RT, серая) связывается с иммобилизованным гибридом (II). После инициирования обратной транскрипции, правильно спаренный по основанию фосфолинкленный нуклеотид связывается в активном сайте фермента (III). Связанный нуклеотид может либо диссоциировать из комплекса, либо стать включённым в растущую цепь ДНК, что сопровождается выделением меченого пирофосфата (IV). HIV RT затем перемещается в следующую позицию, и цикл реакции (II) - (IV) повторяется.
- (b) Гибрид для демонстрации обратной транскрипции SMRT, показывающий матрицу РНК (пурпурная), праймер ДНК (оранжевая) и полученную ДНК.
- (c) Пример следа обратной транскрипции SMRT.
- (d-e) Увеличенные изображения начала и конца всего процесса.

Применение SMRT-секвенирования

Секвенирование метилированной и гидроксиметилированной ДНК

Вводная: Традиционное бисульфитное секвенирование



Недостатки:

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

14

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

spbu.ru

Далее рассмотрим пример использования метода одномолекулярного секвенирования в реальном времени для определения профиля метилирования и гидроксиметилирования цитозина.

Это важно. Метилирование и гидроксиметилирование ДНК связаны с различными заболеваниями и являются общепризнанными признаками рака.

Традиционно используется метод бисульфитного секвенирования. Схема представлена на слайде

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

Метод имеет недостатки:

1. Неполное превращение азотистых оснований даёт неправильные результаты. Полное возможно только в денатурированной одноцепочечной ДНК. Необходима точная подборка условий эксперимента (температура, концентрация солей).
2. Высокая температура и долгая инкубация, могут привести к дегградации ДНК.
3. 5-гидроксиметилцитозин превращается в цитозин-5-метилсульфонат, который при секвенировании опознаётся как цитозин. Нельзя различить 5-гидроксиметилцитозин и цитозин.

Применение SMRT-секвенирования

Секвенирование метилированной и гидроксиметилированной ДНК



15

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. Т. 21, № 1. С. 54. IF 14.028

spbu.ru

Секвенирование пиридин-бораном (TAPS) с помощью TET – новый метод определения 5mC и 5hmC, в котором используются мягкие реакции, основанные на окислении 5m и 5hm до 5-карбоксилцитозина (5caC) с помощью энзима TET (ten-eleven translocation) с последующее восстановлением пиридинборана 5caC до дигидроурацила (DHU).

Во время амплификации ПЦР DHU распознается как тимин, что приводит к переходу 5mC / 5hmC-T.

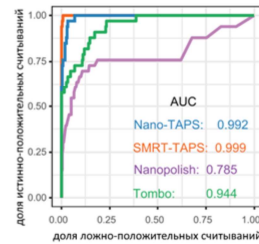
Для различения 5mC и 5hmC:

- β -глюкозилтрансфераза (β GT) может пометить 5hmC глюкозой, препятствуя окислению.
- Перрутенат калия может избирательно окислить 5hmC до 5fC.

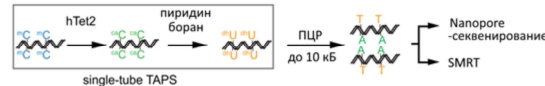
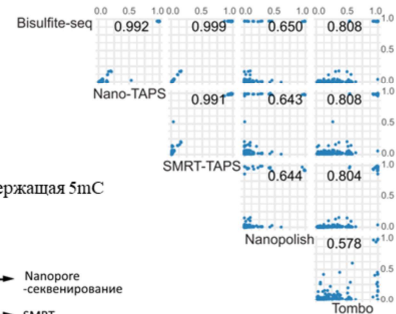
В отличие от жесткой бисульфитной обработки, TAPS сохраняет длинные молекулы ДНК размером более 10 т.п.н. и таким образом хорошо подходит для SMRT.

Применение SMRT-секвенирования

Секвенирование метилированной и гидроксиметилированной ДНК



Модель:
4 kbp ДНК, содержащая 5mC



16

Liu Y., Cheng J., Szejka-Zielińska P., Weldon C., Roberts H., Lopopolo M., Magni A., D'Arizzeno 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. С. 54. IF 14.028

spbu.ru

Метод SMRT был испытан в сравнении с другими на модельных 4 kbp (4000 пар оснований) метилированных фрагментах ДНК, подвергнутых только что описанной процедуре.

Коэффициент линейной корреляции Пирсона 0,999.

SMRT-TAPS обнаружил 5mC всего за 3 прохода и достиг более высокой точности, чем Nano-TAPS.

Appendix:

Nano-TAPS (Нанопоровые системы представляют собой реакционную камеру, внутри которой находится раствор электролита. Камера разделена на две части липидной мембраной или иной тонкой непроводящей поверхностью, в которую внедрена единичная нанопора. К частям камеры прикладывают напряжение, из-за чего возникает ток ионов через пору. Когда исследуемые молекулы проходят через пору по направлению поля, они уменьшают сечение, доступное для ионов, и сила тока падает. Анализируя изменение силы тока, можно определить свойства молекулы, проходящей через пору).

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

17

spbu.ru

В заключение отметим преимущества и недостатки изученного нами метода секвенирования.

Преимущества:

Метод одномолекулярного секвенирования в реальном времени даёт возможность получать очень длинные чтения, т.е. последовательности ДНК (40000-100000 нуклеотидных пар), что облегчает дальнейший анализ данных, сборку геномов, т.к. требуется меньше «сборок». Возможность получения длинных участков ДНК при секвенировании важна также для метагеномики: можно идентифицировать организмы в смешанных популяциях — например, в микробиоме. Этот метод работает без предварительной амплификации исследуемой ДНК посредством ПЦР. Он обеспечивает высокую скорость секвенирования. В теории она ограничивается только скоростью работы ДНК-полимеразы. Для метода характерны высокая чувствительность и специфичность: возможность детектирования в смешанных образцах минорных вариантов с частотой встречаемости меньше 0,1%. Он также даёт возможность секвенирования с высокой точностью. На данный момент она соответствует 83%, но её можно повысить за счёт повторного секвенирования молекулы ДНК (>99% при 15 повторениях).

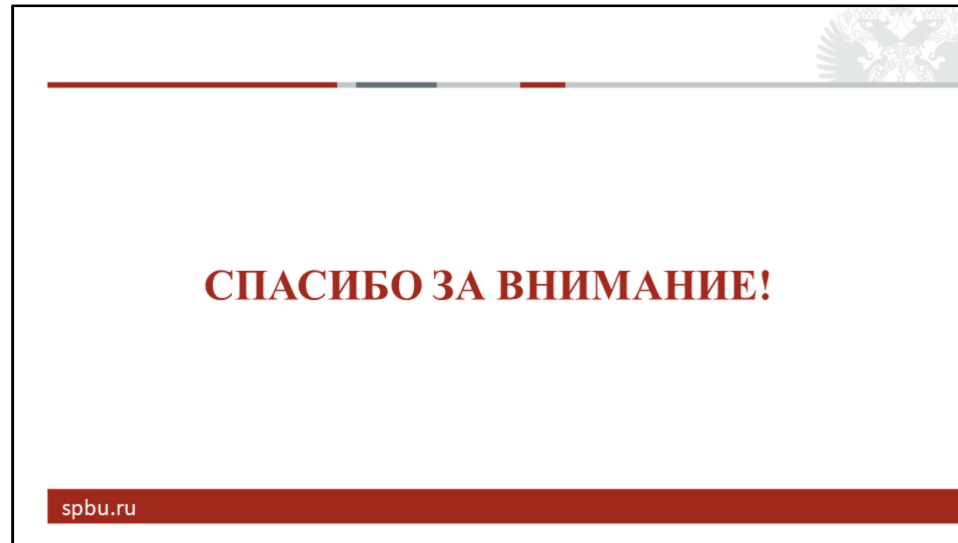
Недостатки:

Высокая стоимость прибора — 600000\$. Для него характерен сравнительно высокий уровень ошибок, обусловленный пересечением спектров излучения флуорофоров. Однако, как уже было отмечено в преимуществах, точность можно повысить за счёт повторного секвенирования ДНК. Кроме того, возможно случайное присоединение полимераз ко дну ZMW-ячейки.

Список литературы

1. Ameer, 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., Ameer, 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

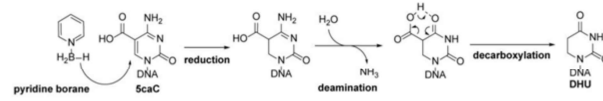
На слайде представлен список литературы.



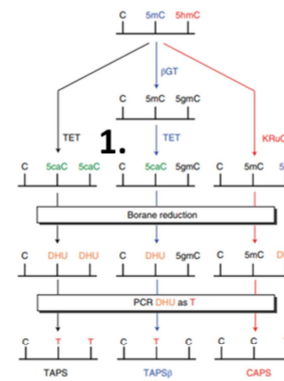
Спасибо за внимание!

Приложение

Механизм восстановления 5саС пиридинбораном



1. ЭНЗИМ ТЕТ окисляет 5mC и 5hmC до 5саС
2. Пиридинборан восстанавливает 5саС до DHU
3. Полимераза распознает DHU как тимин (5mC/5hmC-T)



20

Liu Y., Cheng J., Siejka-Zielińska P., Weldon C., Roberts H., Lopopolo M., Magri A., D'Arenzo 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. С. 54. IF 14.028

spbu.ru