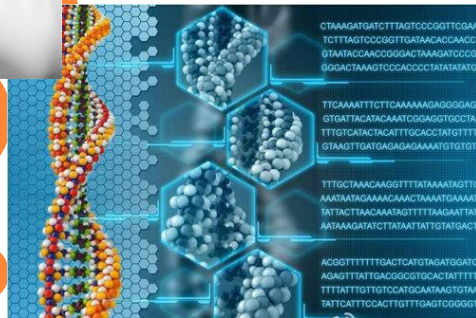
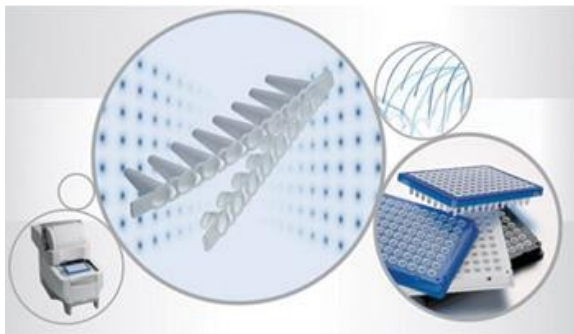
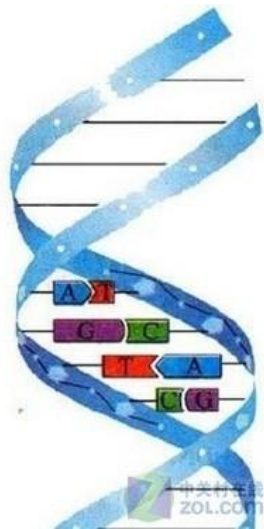
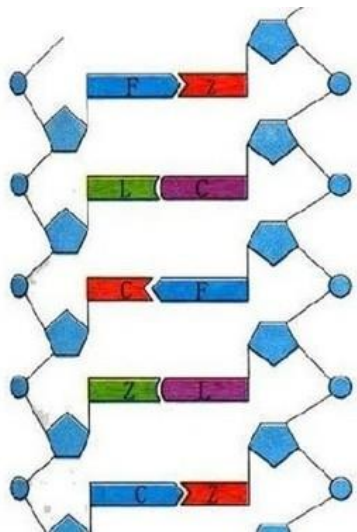


高通量测序技术及其在 系统生物学中的应用



穆婷

20131021



DNA测序:通过各种方法确定特定DNA片段中核酸碱基的排列顺序。



第一代测序技术

Sanger法测序

化学降解法

第二代测序技术

454测序技术

Solexa测序技术

SOLiD测序技术

第三代测序技术

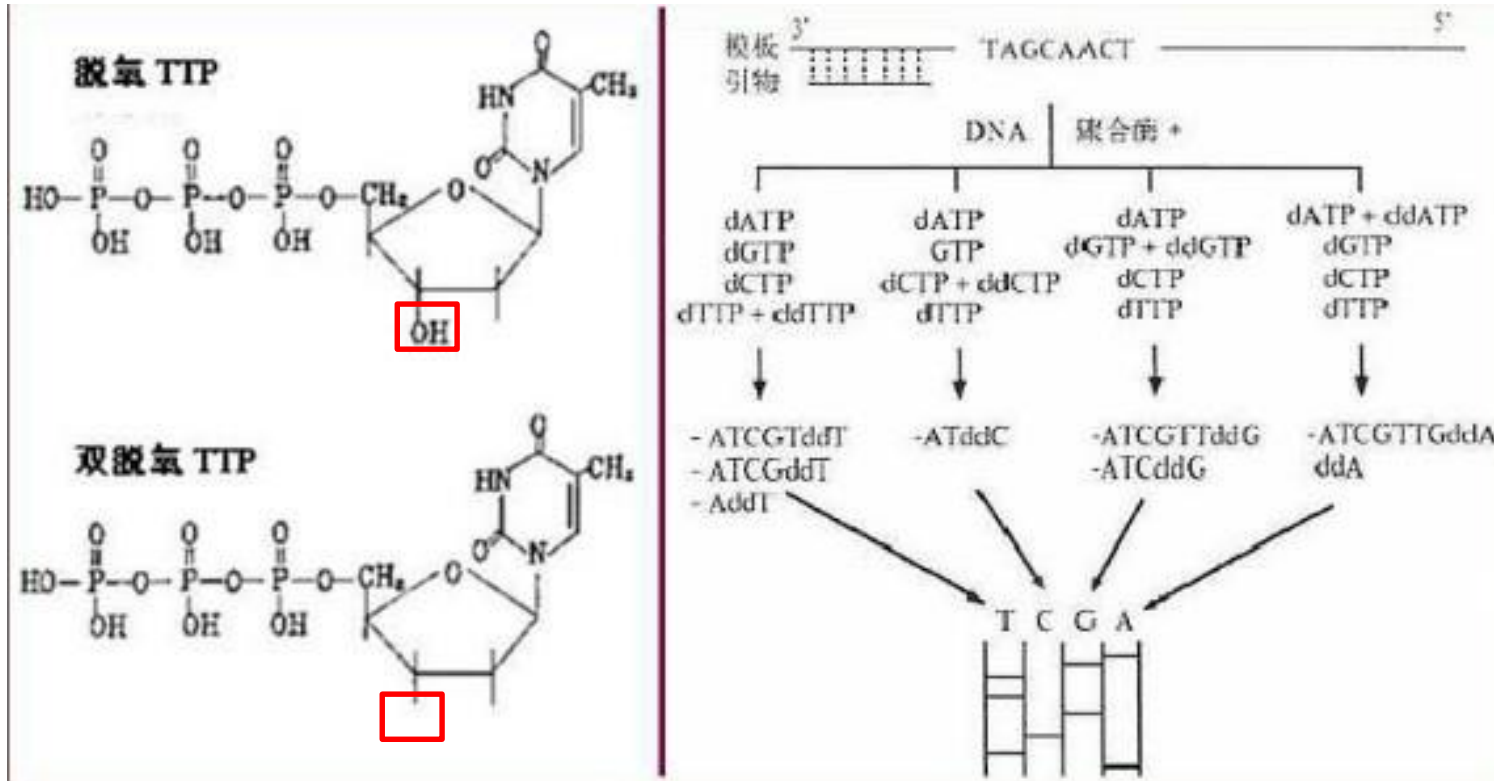
Heliscope测序技术

单分子实时测序技术

纳米孔单分子技术



Sanger法测序（末端终止法）



dNTP中混入1%ddNTP，使互补链以DNA单链为模板进行延伸时，由于ddNTP无法与下一个核苷酸形成磷酸二酯键而延伸随机终止，将形成的大小不一的DNA片段用电泳分离技术分离，由小到大读出末端碱基。

高通量测序

更快的速度

更低的成本

更短的时间



第二代测序技术

运用**冲洗与扫描技术**确定DNA单分子克隆序列的高通量测序方法。

实现高通量的手段：模板预备过程中，将DNA模板固定在支持物表面，使待测模板各自占据一个位点，实现多个位点同时测序且互不干扰。

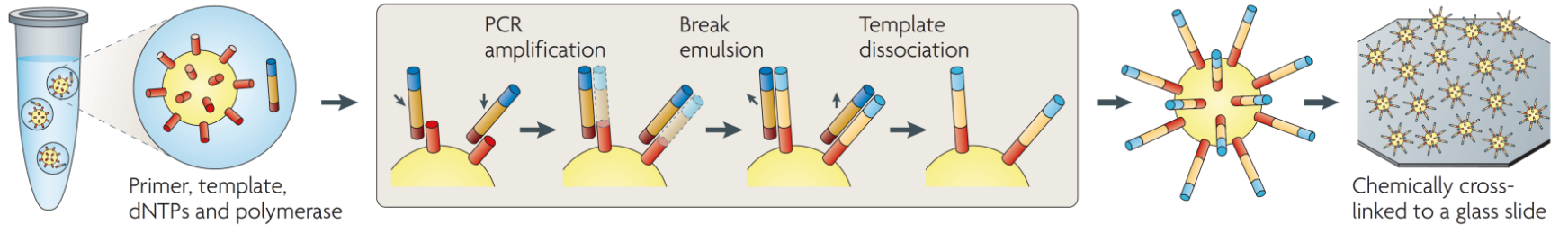
第二代测序技术都包含**模板预备，测序，成像，数据分析**四个环节，但不同的测序平台各有特色。

454测序技术

每个磁珠中只有一种DNA模板（两端有特定的锚定接头），乳液中进行扩增，在每个液滴内形成数千个拷贝，以达到检测所需的信号值。

a Roche/454, Life/APG, Polonator Emulsion PCR

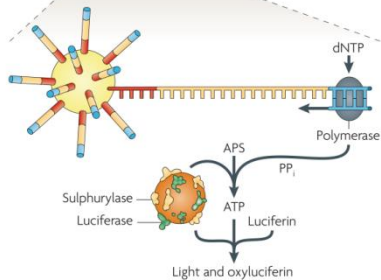
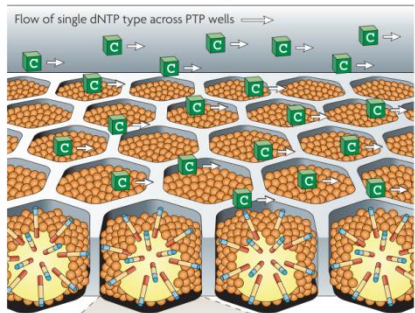
One DNA molecule per bead. Clonal amplification to thousands of copies occurs in microreactors in an emulsion



每孔容纳一个磁珠，每轮测序反应中只加入一种dNTP，若可与磁珠上DNA单链配对，则经酶级联化学反应看，会有光信号传出。然后猝灭光信号，降解剩余ATP和dNTP，进行下一轮测序。

c Roche/454 — Pyrosequencing

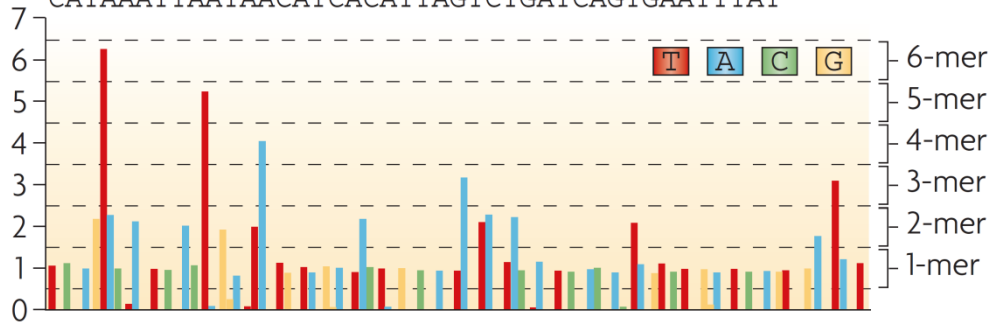
1–2 million template beads loaded into PTP wells



d

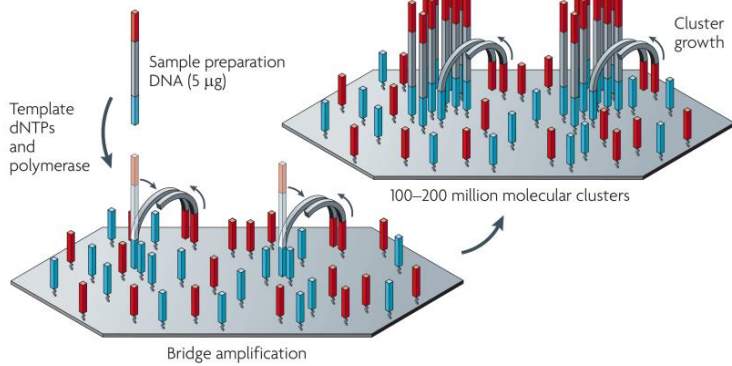
Flowgram

TCAGGTTTTTAAACAATCAACTTTTTGGATTAAAAATGTAGATAACTG
CATAAATTAATAACATCACATTAGTCTGATCAGTGAATTTAT



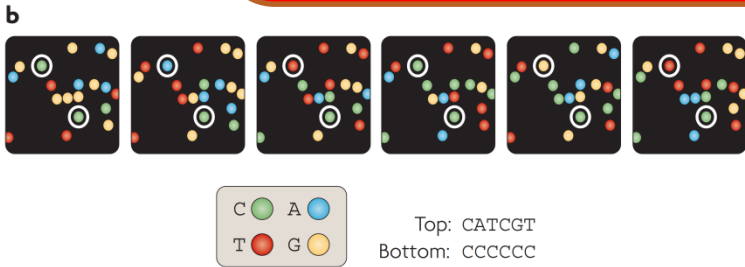
Illumina / Solexa 测序技术

b Illumina/Solexa Solid-phase amplification



桥连扩增

加入带有不同荧光标记且经抑制基团修饰的dNTP，反应后，洗脱未配对的dNTP，检测荧光信息后猝灭荧光并解除抑制基团，进行下一轮测序



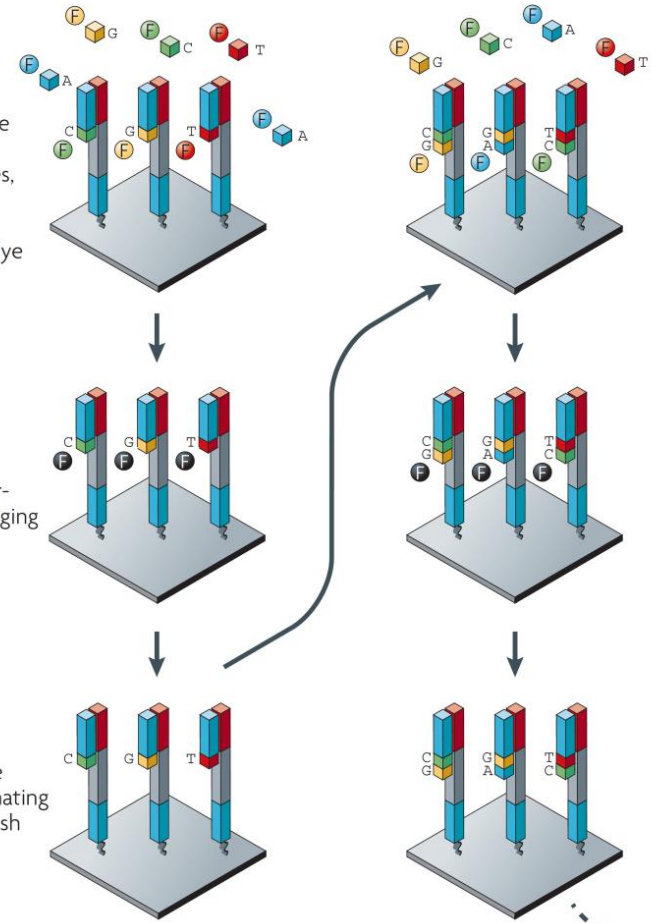
a Illumina/Solexa — Reversible terminators

Incorporate all four nucleotides, each label with a different dye

Wash, four-colour imaging

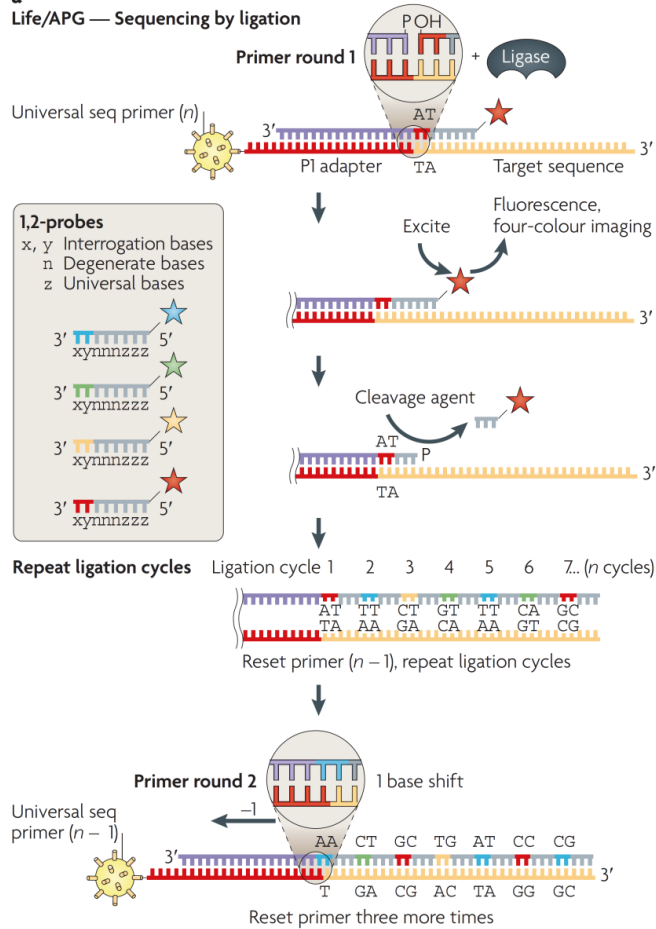
Cleave dye and terminating groups, wash

Repeat cycles



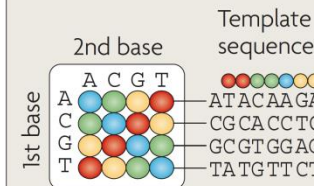
SOLiD测序技术

a
Life/APG — Sequencing by ligation

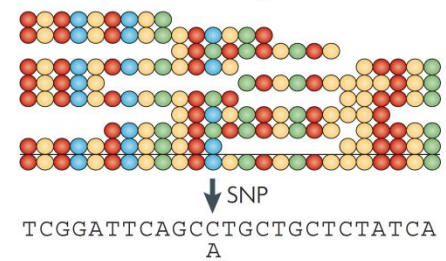


b

Two-base encoding: each target nucleotide is interrogated twice



Alignment of colour-space reads to colour-space reference genome



8碱基单链荧光探针：5' 末端标记与3' 端1,2位碱基有对应关系的荧光染料，n 指随机碱基，z指通用碱基，每轮反应荧光成像后切除z，再加入探针进行反应。第二轮右移一个位置进行反应。至少需要启动5轮反应。

第三代测序技术

连续读取碱基，直接检测单个分子测序信号的单分子测序方法。

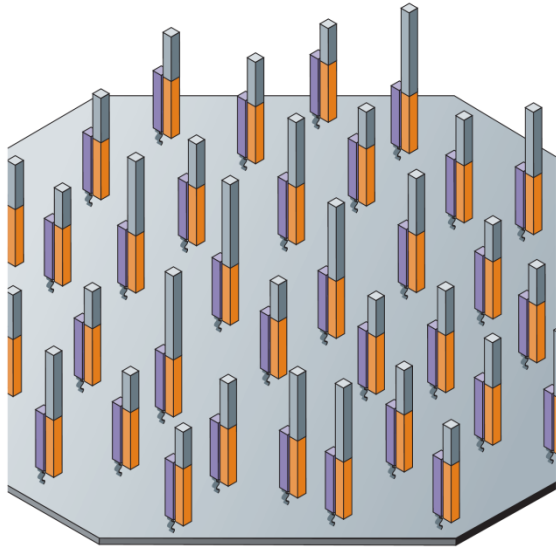
摆脱了繁琐的冲洗与扫描过程，进一步加快测序反应：荧光基团与核苷酸的磷酸键相连，合成酶在掺入碱基时切断磷酸键而释放荧光基团，留下未修饰的DNA片段可继续延伸下一个碱基。



Heliscope测序技术

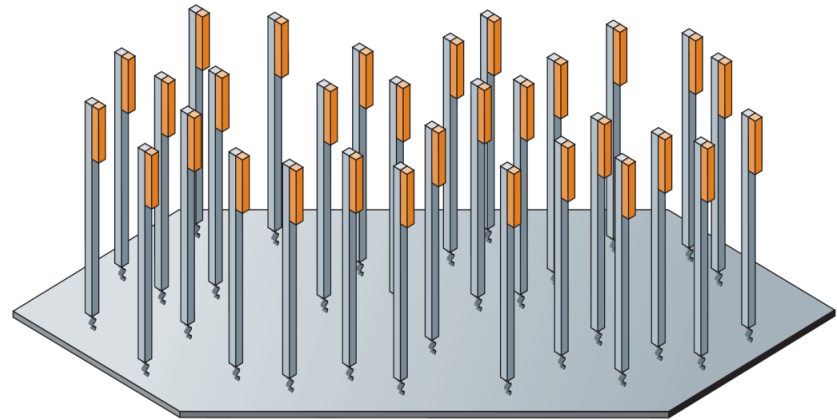
两种扩增方法

c Helicos BioSciences: one-pass sequencing
Single molecule: primer immobilized



Billions of primed, single-molecule templates

d Helicos BioSciences: two-pass sequencing
Single molecule: template immobilized



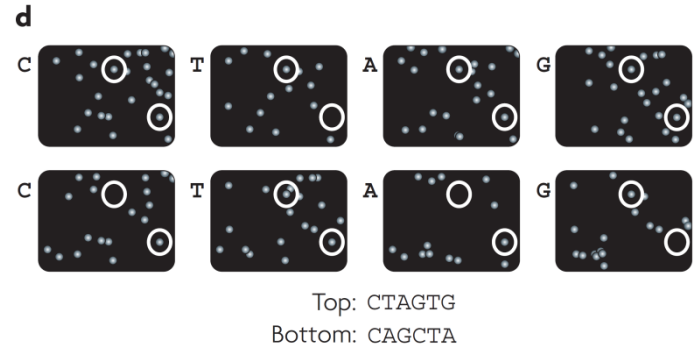
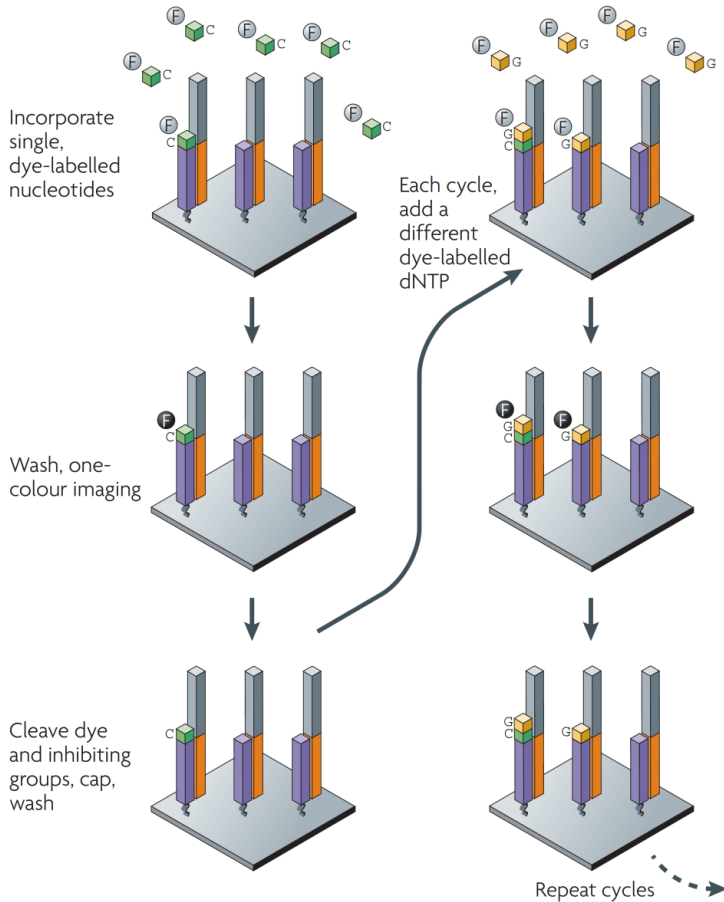
Billions of primed, single-molecule templates

固定引物：将引物探针以共价键连接到固体支持物上，再将模板与引物杂交。用于第一轮测序。

固定模板：第一轮固定引物的测序方法完成后，洗去模板，留下由引物探针延伸而来的互补模板进行第二轮测序。

Heliscope测序技术

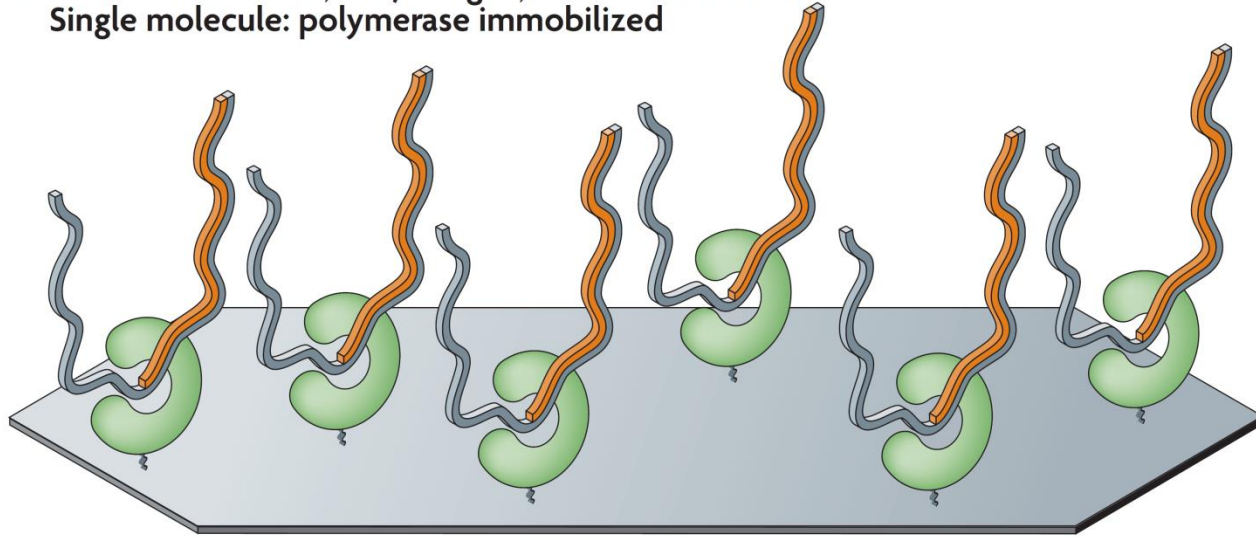
c Helicos BioSciences — Reversible terminators



每轮测序反应只加入一种荧光标记的核苷酸，配对后，洗去多余的核苷酸，荧光成像后，洗去荧光和抑制基团，进行下一轮测序反应。

单分子实时测序技术

e Pacific Biosciences, Life/Visigen, LI-COR Biosciences
Single molecule: polymerase immobilized



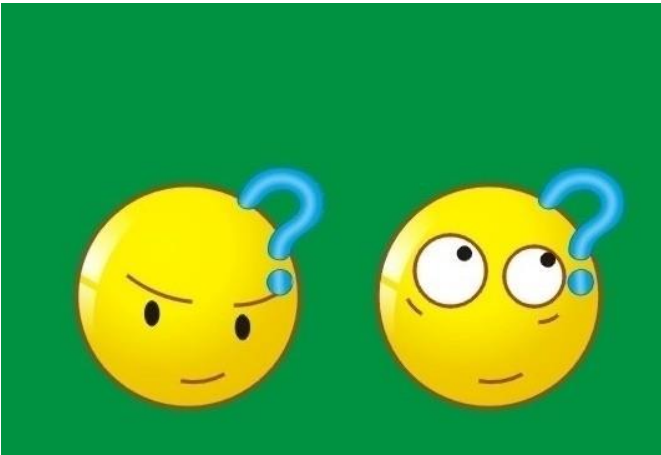
Thousands of primed, single-molecule templates

固定聚合酶于底部

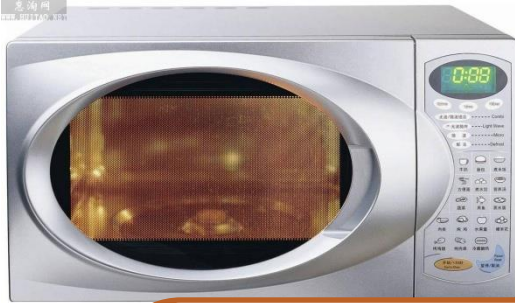


如何在DNA合成期间检测到单个核苷酸的掺入？

成像时体系内荧光标记的核苷酸形成强大的荧光背景，从而无法准确探测到单分子上的荧光。



从微波炉上得到的灵感

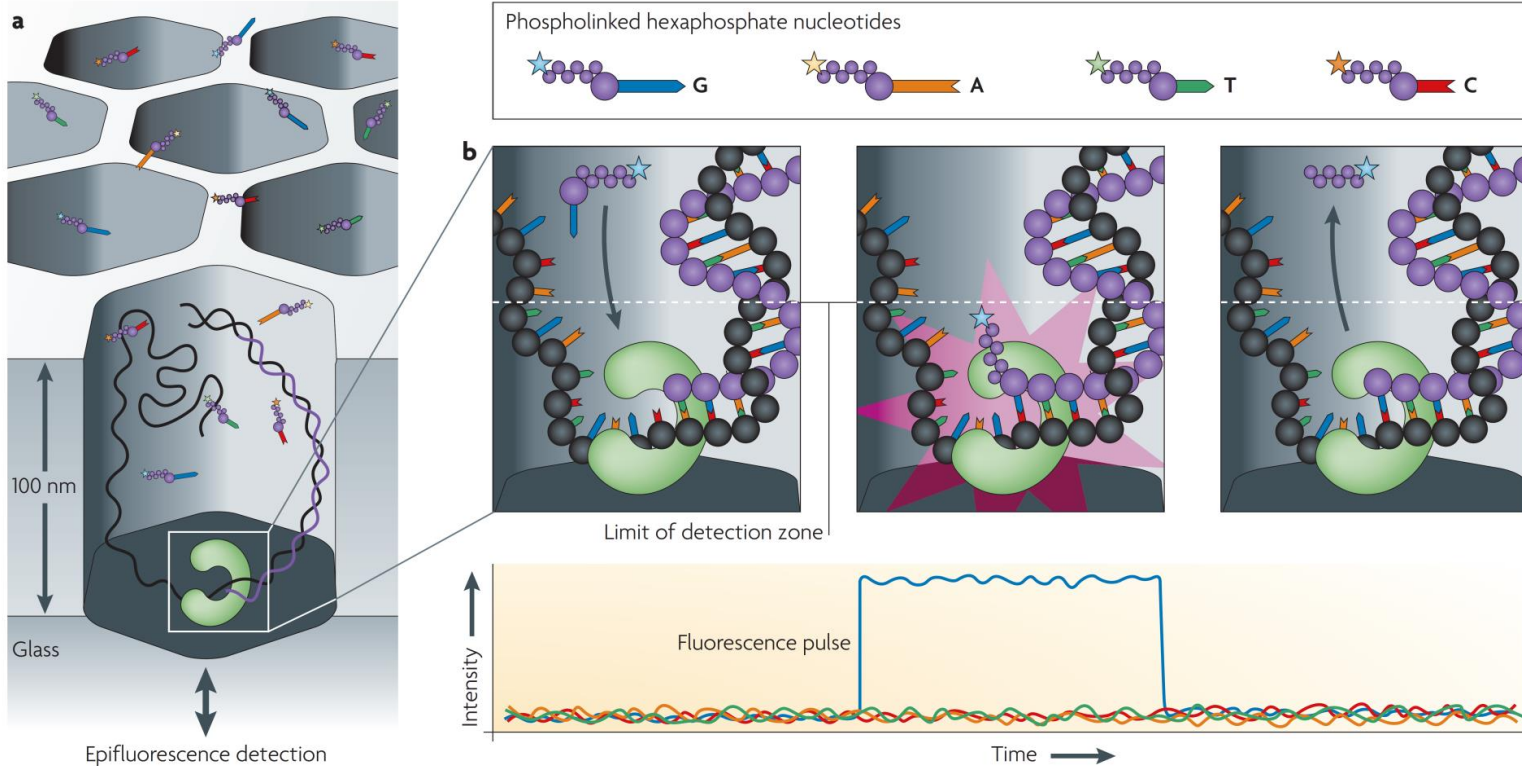


微波炉上的金属筛布布满了比微波波长小的小洞，可阻止微波通过并穿透玻璃，而波长更小的可见光可以通过，故我们可以看到正在加热的食物。



单分子实时测序技术

Pacific Biosciences — Real-time sequencing



底部有一个直径为几十纳米的小孔，可阻止可见激光完全穿透，激光进入后迅速衰减，使得只有下面30nm的部分成为检测敏感区。核苷酸在底部进行配对需要几毫秒且信号强度较高，而单纯扩散的核苷酸只需几微秒，由此进行实时测序的过程。

纳米孔测序技术

原理：核酸外切酶消化单链DNA后，单个碱基落入纳米孔，不同的碱基可以瞬间使电流产生特有的变化，从而进行实时测序。测序后碱基可以从孔的另一侧离开。



高通量测序技术在系统生物学中的应用

单核苷酸多态性鉴定

检测基因组结构改变

识别基因融合

其他方面



单核苷酸多态性鉴定

单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP): 指基因组DNA中某一特定核苷酸位置上发生**转换**, **颠换**, **插入**, **缺失**等变化导致的核酸序列的多态性。

依据排列组合原理, 共6种替换情况, 即A/G,A/T,A/C,C/G,C/T,G/T, 其中**C→T**最为频繁, 因为C常为甲基化的, 自发脱氨后即变为T

SNP的鉴定一般通过**完整基因组重测序**或**特定目标区域的测序**来完成。高通量测序技术的发展使其成本更低, 速度更快。

检测基因组结构改变

染色体的**倒位**和**易位**，难以通过二代测序得到的小片段DNA序列来鉴定，需要通过基因组DNA对比来完成。

高通量测序技术产生高通量的数据，能够**鉴定亚显微结构变异**，极大地促进了基因组结构变异的研究。



识别基因融合

融合基因指将**两个或多个基因的编码区**首尾相连,置于同一套调控序列(包括启动子、增强子、核糖体结合序列、终止子等)控制之下,构成的嵌合基因。

由于**454测序技术**的读长较长,可以更好地用于识别基因融合。
运用高通量测序技术,对于**整个基因组**或**特定序列**进行测序,都能够发现基因融合现象。

其他方面

DNA甲基化研究

识别RNA结合蛋白的靶标

识别小RNA的靶标

等等。。。



**Thank you for your
attention**

