



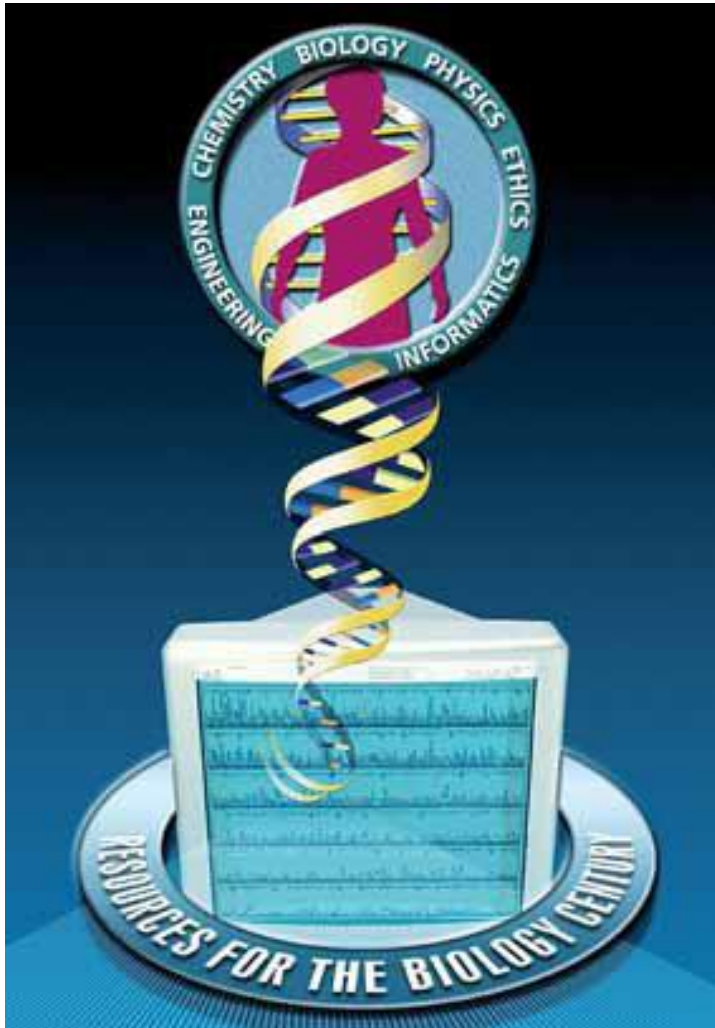
ӘЛ-ФАРАБИ АТЫНДАҒЫ ҚАЗАҚ ҰЛТТЫҚ УНИВЕРСИТЕТІ  
БИОЛОГИЯ ЖӘНЕ БИОТЕХНОЛОГИЯ ФАКУЛЬТЕТІ  
МОЛЕКУЛАЛЫҚ БИОЛОГИЯ ЖӘНЕ ГЕНЕТИКА  
КАФЕДРАСЫ

ДӘРІС 7. ДНҚ МОЛЕКУЛАСЫН СЕКВЕНИРЛЕУ  
МОЛЕКУЛАЛЫҚ ДИАГНОСТИКАНЫҢ ЖАҢА ӘДІСІ.  
ДНҚ БИОЧИПТЕРІ ТУРАЛЫ ТҮСІНІК

Лектор: PhD, қауымдастырылған  
профессор Тайпақова С.М.

## **Дәріс жоспары:**

- **«Адам геномы» бағдарламасы.**
- **Нуклеин қышқылдарын секвенирлеу**
- **Секвенирлеу әдісінің даму тарихы**
- **ДНК секвенерлеу әдісінің қолдануы**
- **ДНҚ молекуласын секвенирлеудің әдістері**
- **Келесі ұрпақ секвенирлеу әдісі- next-generation sequencing (NGS)**



## «Адам геномы» бағдарламасы.

Биология ғылымы саласындағы қаржыландыруы өте жоғары жобалардың біріне жатады. Адам геномын білу адам биологиясы және медицина саласына баға жетпес құнды ақпарат береді.

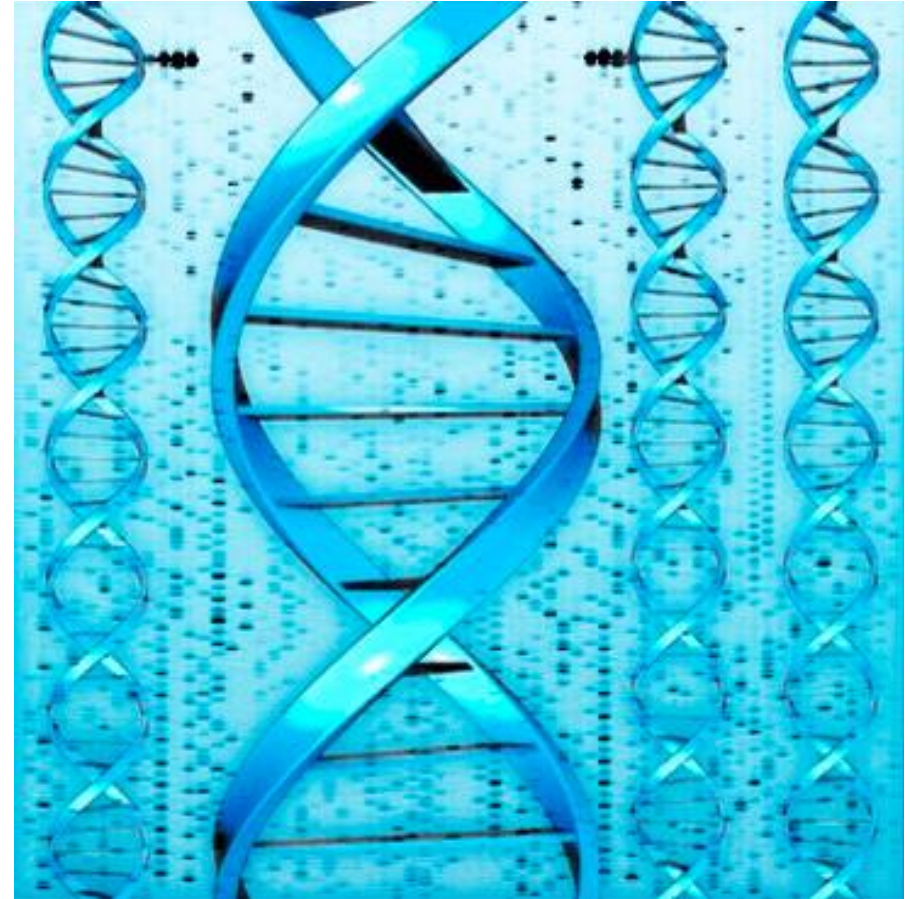
1990 жылы адам геномын зерттейтін халықаралық орталық құрылады (*Human Genome Organization*) (HUGO). Бұл орталық «адам геномына» байланысты ғылыми жұмыстарды 6 мемлекетте өз бақылауын алды: Германия, Англия, Франция, Япония, Китай және АҚШ.

Адам геномы бағдарламасының құны шамамен 3 млрд АҚШ долларына тең.

Адам геномы шамамен 3 млрд жұп нуклеотидтен тұрады.

Бұл адам клеткасындағы ДНҚ молекуласының құрылымы.

- Шамамен 20 000–25 000 генді анықтау;
- 3 млрд жұп нуклеотидтерден тұратын адам ДНҚ молекуласын анықтау және оны арнайы қорда сақтау;
- Бұл ақпараттарды өңдейтін құрылғыларды жетілдіру;
- Жаңа технологияларды пайдалану;
- Геномды анықтау кезінде туындайтын этикалық, құқықтық, әлеуметтік сұрақтарды зерттеу.

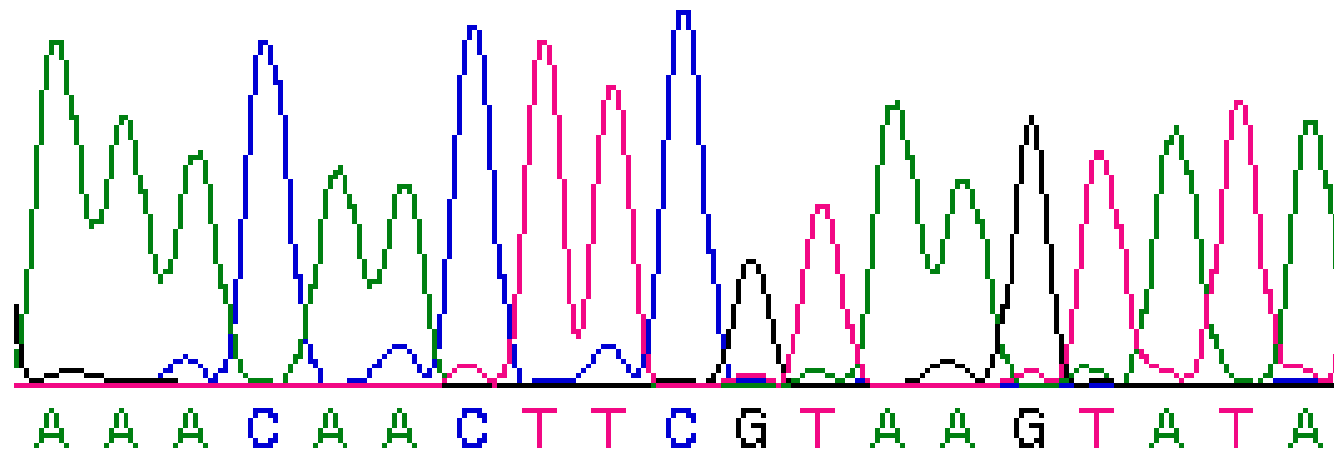


ДНҚ және РНҚ молекулаларын секвенирлеу процесі көпсатылы және күрделі болып табылады.

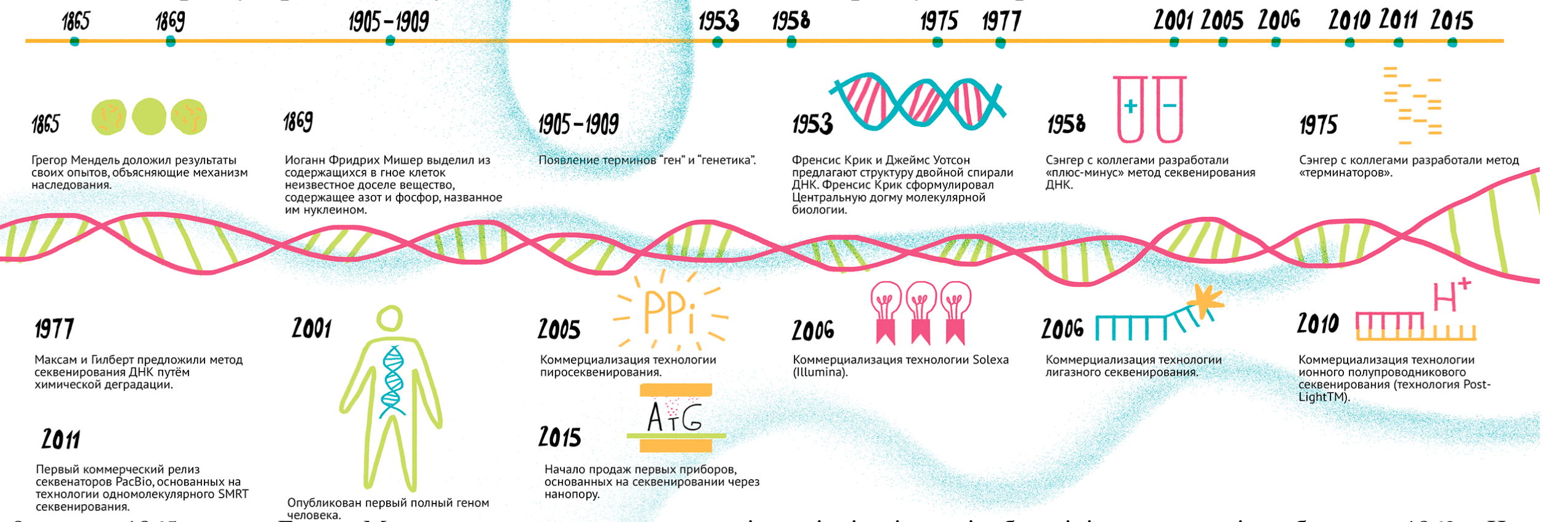
Алғашқыда секвенирлеу процесі тек кейбір лабораторияларда ғана қолжетімді болатын. Қазіргі кезде ғылыми-зерттеу жұмыстарымен айналысатын әр екінші лаборатория бұл жұмысты жүзеге асыра алады.

Әр жыл сайын геномды, транскриптомды, эпигеномды және экзомды секвенирлеу қарапайым әдістердің біріне айналууда.

**Нуклеин қышқылдарын секвенирлеу** - (басқаша айтқанда, нуклеотидтік тізбектірен анықтау) - бұл ДНҚ немесе РНҚ молекулаларының бірінші реттік құрылымын анықтау, яғни бұл құрылымдар олардың құрамындағы азоттық негіздерге байланысты белгіленеді: **аденин (A)**, гуанин (G), **цитозин (C)**, **тимин (T)**, және РНҚ жағдайында урацил (U).



# Геномдық зерттеулердің және нуклеин қышқылының секвенирленуінің тарихы.



8 наурыз 1865 жыл - Грегор Мендель тұқым қуалау механизмін түсіндіретін тәжірибелерінің нәтижелерін хабарлады. 1869 - Иоганн Фридрих Мишер құрамында азот пен фосфор бар осы уақытқа дейін белгісіз затты ірің клеткаларынан бөліп, оны нуклеин деп атады. 1905-1909 жж - «ген» және «генетика» терминдерінің пайда болуы. 1953 - Фрэнсис Крик пен Джеймс Уотсон ДНҚ қос спиралының құрылымын ұсынды. 1958 - Фрэнсис Крик молекулалық биологияның орталық догмасын тұжырымдады. 1975 - Сэнгер мен әріптестері ДНҚ секвенирлеудің «плюс немесе минус» әдісін әзірледі. 1977 - Сэнгер тобы терминатор әдісін құрастырды. 1977 - Максам мен Гилберт химиялық деградация арқылы ДНҚ секвенирлеу әдісін ұсынды. 2001 - Адамның алғашқы толық геномы жарияланды. 2005 - пиросеквенирлеу технологиясы коммерцияландырылды. 2006 - Solexa технологиясын коммерцияландыру (Illumina). 2006 ж. - лигазды секвенирлеу технологиясы коммерцияландырылды. 2010 - иондық жартылай өткізгіш секвенирлеу технологиясын коммерцияландырылды (PostLight™ технологиясы). 2011 - Бір молекулалы SMRT секвенирлеу технологиясына негізделген PacBio секвенаторларының бірінші коммерциялық шығарылымы. 2015 жыл - нанопораларда секвенирлеуге негізделген алғашқы құралдарды сатудың басталуы.

- 
- 1973 : First sequence of 24 bp published
  - 1977 : Sanger sequencing method published
  - 1980 : Nobel Prize Wally Gilbert and Fred Sanger
  - 1982 : Genbank started
  - 1983 : Development of PCR
  - 1987 : 1<sup>st</sup> automated sequencer : Applied Biosystems Prism 373
  
  - 1996 : Capillary sequencer : ABI 310
  - 1998 : Genome of *Caenorhabditis elegans* sequenced
  - 2000 : Human genome sequenced
  - 2005 : 1<sup>st</sup> 454 Life Sciences Next Generation Sequencing system : GS 20 System
  - 2006 : 1<sup>st</sup> Solexa Next Generation Sequencer : Genome Analyzer
  - 2007 : 1<sup>st</sup> Applied Biosystems Next Generation Sequencer : SOLiD
  - 2009 : 1<sup>st</sup> Helicos **single molecule** sequencer : Helicos Genetic Analyser System
  - 2011 : 1<sup>st</sup> Ion Torrent Next Generation Sequencer : PGM
  - 2011 : 1<sup>st</sup> Pacific Biosciences **single molecule** sequencer : PacBio RS Systems
  - 2012 : Oxford Nanopore Technologies demonstrates ultra long **single molecule** reads



## **ДНК секвенерлеу әдісінің қолдануы:**

Геномдық анализ

Медицина

Микрорганиздердің метагеномикалық анализы

## **Мақсаты мен маңызы :**

- Нуклеотидтік деңгейде гендерге анализ жасау;
- Гендердің кодталуын және экспрессиясын жақсырақ түсіну;
- Плазмидалардағы гендердің арнайы сайттарын анықтау;
- Мутациялық сайттарды анықтау.

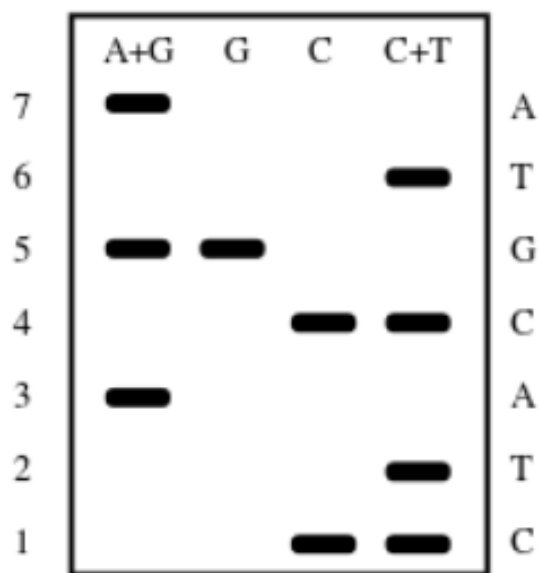
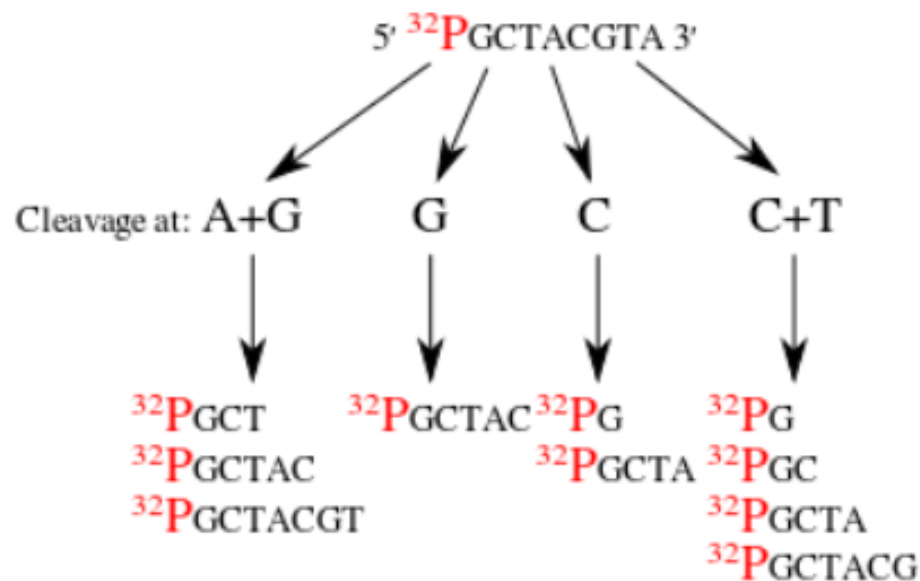
**ATACTCTGAGCCCTGCT**CGGTTTAGGCCTGTCTGCGGAATCCGCACCAACCAGCACCATGCCCCATGATAC  
TGGGGTACTGGGACATCCGCGGGGTGAGCGAGGGTCCGCTGGACGGTGGGACGAGGGCGCAGGGGAGGGA  
AGTGCGAAGCAGCTGCGGGACGGACTCTAGGGACCGTTCCTCTTCAGGGCTGCCCGCCTCAGAAGGGCCT  
GTGCATGCCGCTGTGTGTGTGTTGGGGGTGTGGGCGGGTAGAGGAGGCAACGGGTACGTGCAGTGTAAAC  
TGGGGGCTTCCCTGGTGCAGACAAAGTCAGGGACCTCCATCTCTGACGCGACCTGCGGGCCATCTCTCC  
CAGCTGGCCACGCCATCCGCCTGCTCCTGGAATACACAGACTCAAGCTATGAGGAAAAGAAGTACACGA  
TGGGGGACGGTAATGGCACCCCTCGTGTTCGGGCTCTGCCACTCACGCTAAGTTGGCACCAAGCAACCCA  
TGGTGGCCACCTGTGGCTGCCTCTGCAGGCCCTCCCTGCTGGAGCTGCAGGCTGTCTCTTCCCTGAGCCC  
CGGTGAGGGAGCCCTCTGGCCTTGCAAGGCAGAATGCTGGGGTGGGATGCTGGGCCCCCTGTCTAATTGG  
GACGGGTGTCCCTCAGGGCTTGCCATAACCTGGAAGCCTTAGCTGTGTGGGGTCCAGAGCCCTCAGCGG  
GATTCTTTGTCCCTGAACCCTGGGATGTGGGACTGAGTGGTCAGATTCTAGATCCACCTGTCTCAGGGAT  
CTTGCCACTGGCTCCGTGGGAGGGTCCCCGGAAGGAGGGCTGGGCTCTGGGGAGGTTTGTTCCTACTTC  
TTCTTCCCCACCACAGCTCCTGATTATGACAGAAGCCAGTGGCTGAATGAAAAATTCAAGCTGGGCCTGG  
ACTTTCCTCAATGTAGGTGCAGGGGAAGGGCGGTTTTGGGGGAAAGTGCAACGTGTCTCTGACTGCATCT  
CCTCTCCCCAGCTTAGAGGTGTTAAGATCAGGAGTCTTCTGCCCAATTCCTCTCACTCCTGGCTGTCTAA  
ACAGTCCTTCCATGATGTTCTGTGTCCACCTGCATTCGTTTCATGTGACAGTATTCTTATTTTCAGTCCTGC  
CATGAGCAGGCACAGTGAGTGCCCGGTCTCCTCTCTGCTCTTGCTTATGGGAAGGGGATGCTGGGGAGCC  
TGGTGGCCCAACTGAGCTTCGCCGGTTTTCCCATCCATCCAGCTGCCCTACTTGATTGATGGGGCTCACAA  
GATCACCCAGAGCAACGCCATCTTGTGCTACATTGCCCGCAAGCACAACCTGTGTGAGTGTGGGTGGCTG  
CAATGTGTGGGGGAAGGTGGCCTCCTCCTTGGCTGGGCTGTGATGCTGAGATTGAGTCTGTGTTTTGTG  
GGTGGCAGGTGGGGAGACAGAAGAGGAGAAGATTCGTGTGGACATTTTGGAGAACCAGACCATGGACAAC  
CATATGCAGCTGGGCATGATCTGCTACAATCCAGAATTTGTGAGTGTCCCCAGTGAGCTGCATCTGACAG  
AGTTTGGATTTGGGGCCAGGACTCTTGCAATTCCTGCACACACTGGTCTTAAGTCCCTGGTACCATTTCATC  
CTCCAAGTGCTTTCCCATACTATCAGCAGTTATTCTCACGACTCCAATGTCATGTCAACAAAAGCAGAGG  
CAATTCACCAACCTTAGGACACGATCCAGGCATCCAGGGTAGAAATTCAGTTCCTGTATGGTAAAGT  
TTGTGTTTCAGAATCTCCTTCATCAGCTCTGGCCTCTGACTTCTGTCCTGGGTCATTTCTGTGTCAGCCAGTT  
CACATCACCTGCCTGCTCCTAGAATATGCAGACTCAAGTAGAAGACTCAGGAATGTAATGGCACCCCTCGA  
ATTGCATCTTCTCCTCAACAGTTTTCTGAGTGTGTCATTGACATGCACAGGGATCTGCGCATTTTCATA  
ACAGACAGCTCAGAGGCAGTCAGAGGGCCTTTATTTCCTCTCCC**TCCTTCCTTTCAACTTGAACCTTCTCAT**

# Нуклеотидтік тізбек

# Қазіргі кезде ДНҚ молекуласын секвенирлеудің бірнеше әдістемесі бар

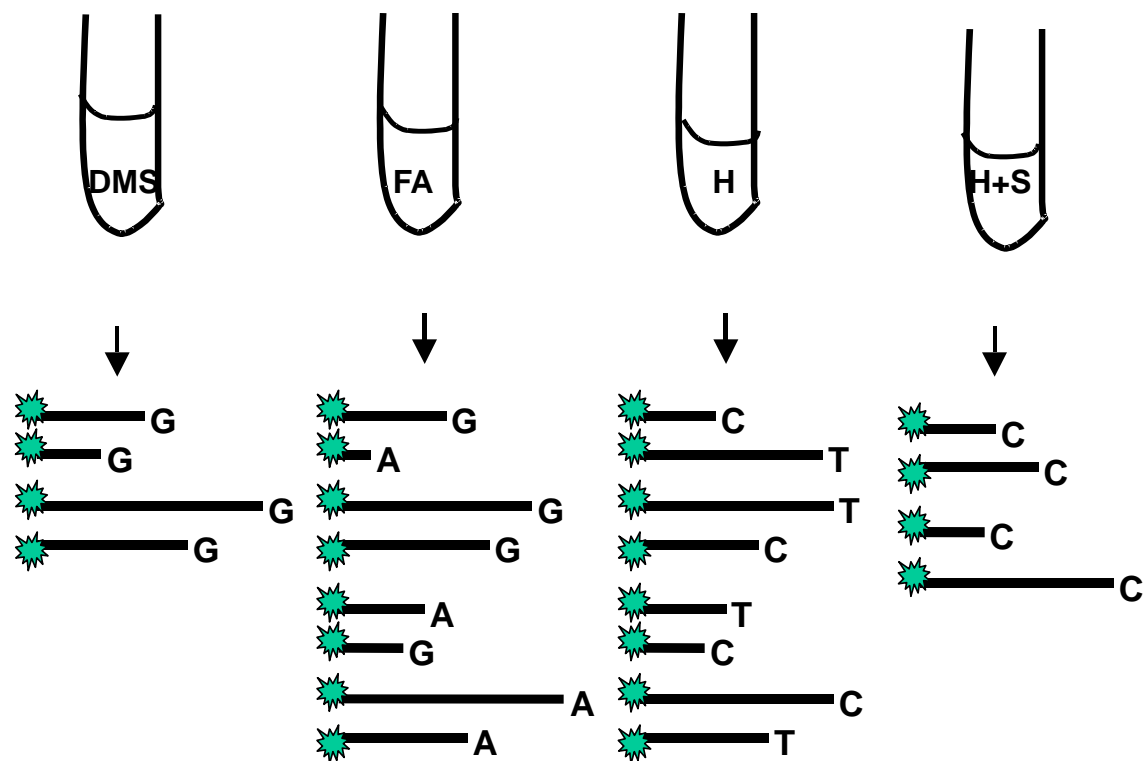
- **Максам және Гильберт әдісі**
- **ДНҚ молекуласын секвенирлеу Сэнгер әдісі: «плюс-минус» және «терминатор» әдісі**
- **Шотган (Shotgun) секвенирлеу әдісі**
- **Секвенирлеудің «екінші кезеңіне» жататын әдіс - next-generation sequencing (NGS)**
- **Пиросеквенирлеу**
- **Ионды жартылай өткізгішті секвенирлеу**
- **Бір молекулаға негізделген секвенирлеу**

# Максам және Гильберт әдісі



Sequencing Gel

- Бұл әдіс 4 азоттық негіздер бойынша 5' ұшты радиоактивті белгісі бар ДНК-ның химиялық модификациясына негізделген. Арнайы төрт химиялық реакциялар арқылы азоттық негіздерді өзгеріске ұшыратып, **фосфодиэфирлік байланыстарды үзеді**.
- ДНК-ның толық нуклеотидті реттілігін анықтау үшін көп мөлшерде бірдей ДНК-молекулалары қажет.
- Әр тізбектің 5' немесе 3' ұшына радиоактивті белгі енгізеді.
- ДНК-ны балкытып, біртізбекті ДНК бөлініп алынады.
- Әр пробиркаға 1 немесе 2 белгілі азоттық негіздерді арнайы бұзатын химиялық реагент қосылады.
- Нәтижесінде осы нуклеотид орналасқан жерде ДНК тізбегі бұзылады.
- Ұзындықтары әртүрлі біртізбекті ДНК-ның радиоактивті белгімен белгіленген фрагменттер қоспасы түзіледі.
- Келесі сатыда қоспадағы компоненттерді полиакриламидті электрофорезде бөледі.



## Азоттық негіздердің химиялық модификациясы:

Құмырсқа қышқылы депуринизация (А+Г) үшін пайдаланады. Мысалы, пиперидин дезоксирибозасының дегликлозилденген альдегид тобымен әркеттесіп, Шифф негізін түзеді де, **аденин** мен **гуанин** қалдықтары бойыша арнайы ыдырауы жүреді.

**Диметилсульфат** көмегімен Гуанин метильденуі жүреді

**Гидрозан** қатысуымен Пиримидиндер(С+Т) гидролизі жүреді. Реакцияға NaCl қосқан жағдайда цитидин гидролизі тежеледі

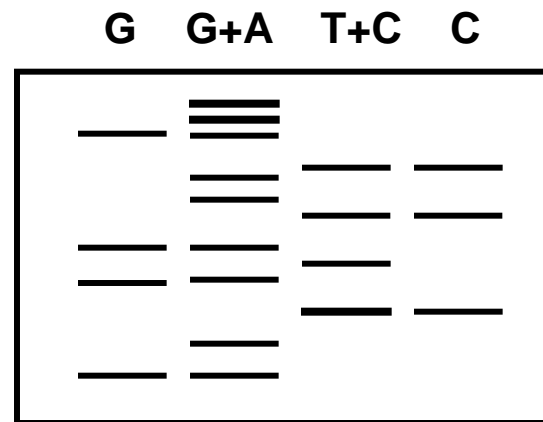
Модификацияланған негіздер температураны жоғарылату арқылы, не қышқыл әсерінен не химиялық агенттер мысалы пиперидин көмегімен аластатылады

# Максам және Гильберттің химиялық әдісі

Ұзын фрагмент



Қысқа фрагмент



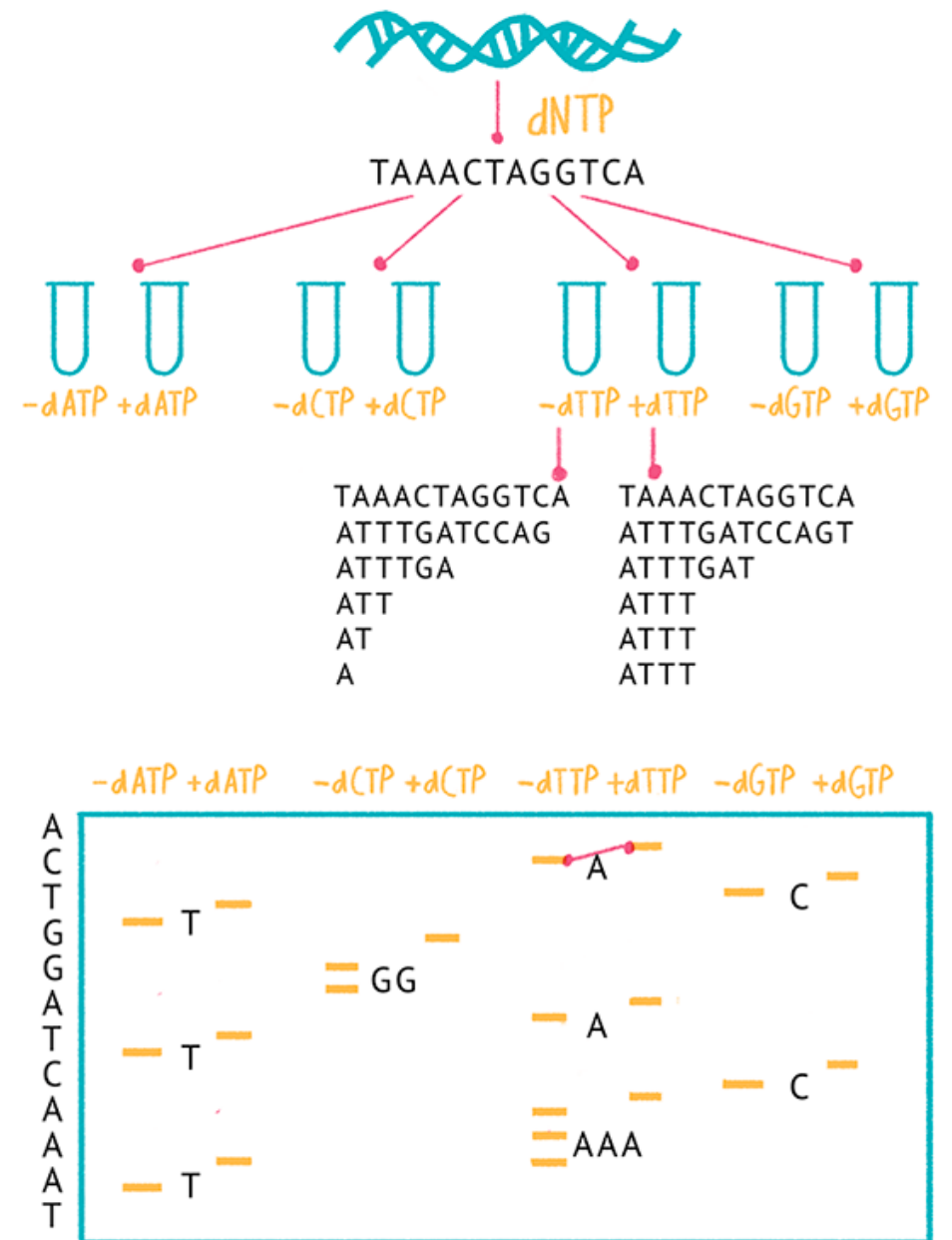
3'  
A  
A  
G  
C  
A  
A  
C  
G  
T  
G  
C  
A  
G  
5'

Секвенстелген гельді астынан үстіге қарай оқиды (5'-тен 3').

# ДНҚ молекуласын секвенирлеудің «Плюс-минус» әдісі

ДНҚ молекуласын радиоактивті белгіленген нуклеотид және ДНҚ-полимераза ферменті арқылы секвенирлеуді 1977 жылы Сэнгер ұсынды. Уақыт өте келе бұл әдіс жетілдірілді және қазіргі кезде секвенирлеудің негізі ретінде саналады.

Бұл әдіс арқылы 1000 жұп негізді анықтауға болады және ол қысқа фрагменттерді немесе сәйкес гендерді анықтауға негізделген.



Мұнда матрица ретінде біртүзбекті ДНҚ молекуласы қолданылды. Праймерлер ретінде – синтетикалық олигонуклеотидтер немесе рестрикциялық эндонуклеаза ферменттері арқылы кесілген ДНҚ молекуласының қысқа субфрагменттері қолданылды. ДНҚ молекуласының синтезін жүзеге асыратын фермент ретінде E.coli бактериясынан бөлініп алынған Кленов фрагменті (ДНҚ-полимераза I (PolI) ферменті қолданылды.

## **Әдіс екі кезеңнен тұрады:**

- Алғашқыда полимеразды реакция жүргізеді, мұнда қоспа құрамында барлық 4 нуклеотидтер болады (dNTP) және оның біреуінің фосфаты белгіленген болады. Синтез кезінде матрицалық фрагменттің толық көшірмесі алынбайды.
- Келесі ретте бұл қоспаны байланыспаған дезоксинуклеотидтерден тазартады және оны 8 пробиркаға бөледі. Ары қарай «плюс» жүйеде 4 пробиркада төрт нуклеотидтің қатысында реакция жүргізеді. Келесі «минус» жүйеде 4 пробиркада бір нуклеотидті қоспай жүргізеді. Нәтижесінде "минус" жүйеде терминация процесі dNTP алдында, ал «плюс» жүйеде қоспаға қосылмаған нуклеотидтен кейін жүрген. Осындай жолмен алынған 8 үлгілер электрофорез арқылы ажыратылып, нуклеотидтер тізбектері анықталған.

фХ174 бактериофагының ДНҚ молекуласы осы тәсілмен анықталған (5386 н.ж.)

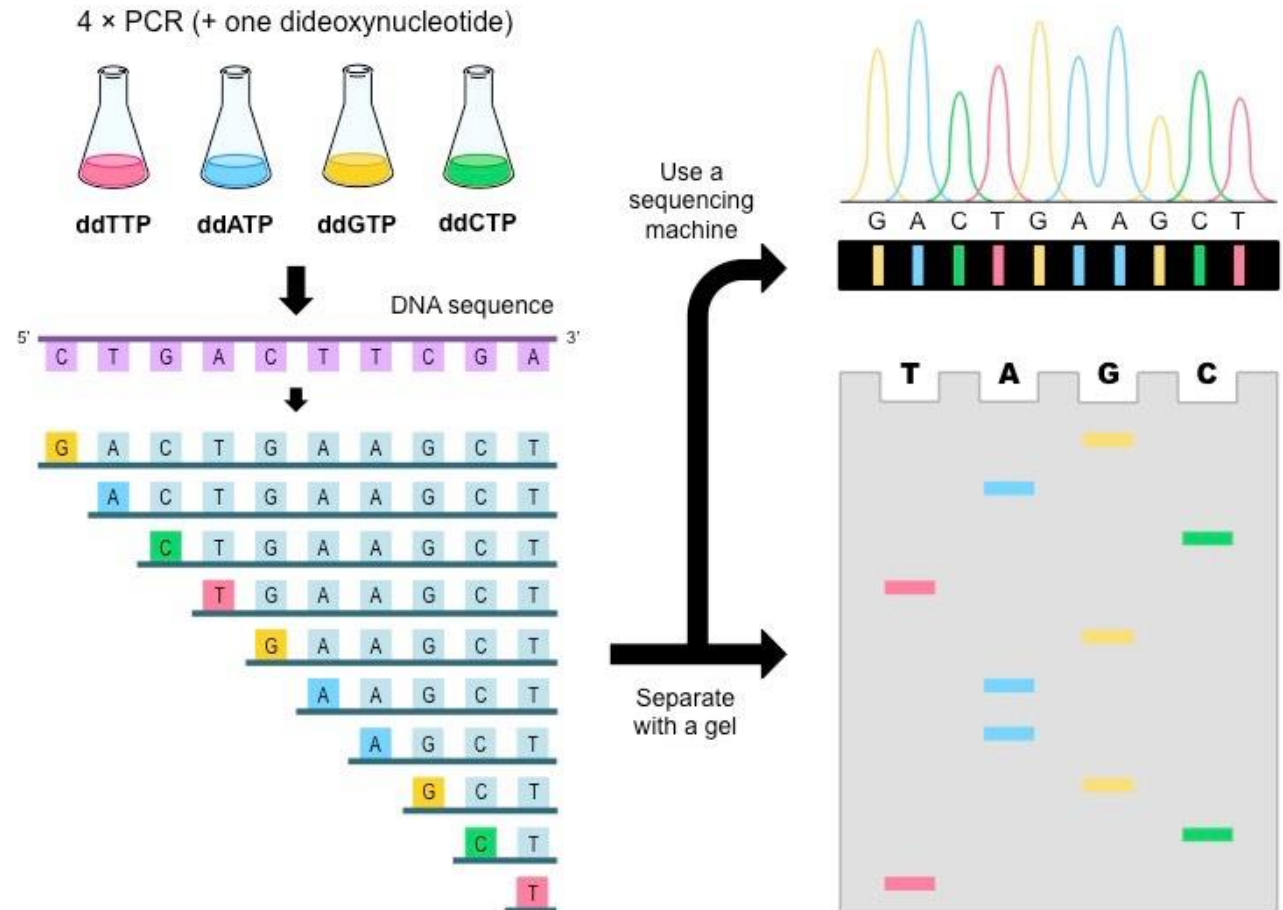


1977 жылы Сэнгер және оның әріптестері секвенирлеу әдісін ары қарай жетілдіру арқылы «терминатор» әдісін ұсынды.

Қазіргі кезде де бұл әдістің жетілдірілген түрі секвенирлеуде қолданылады.

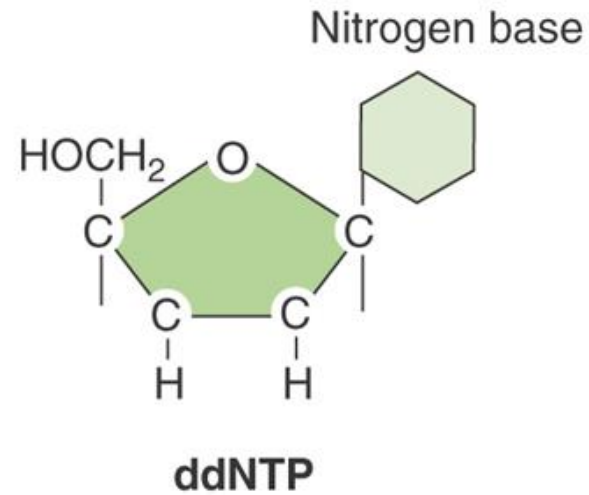
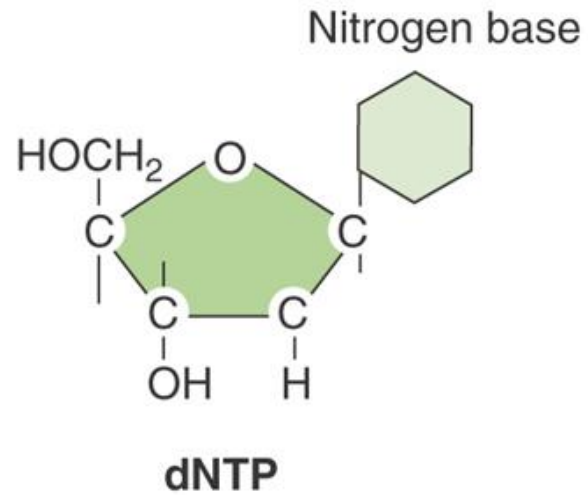
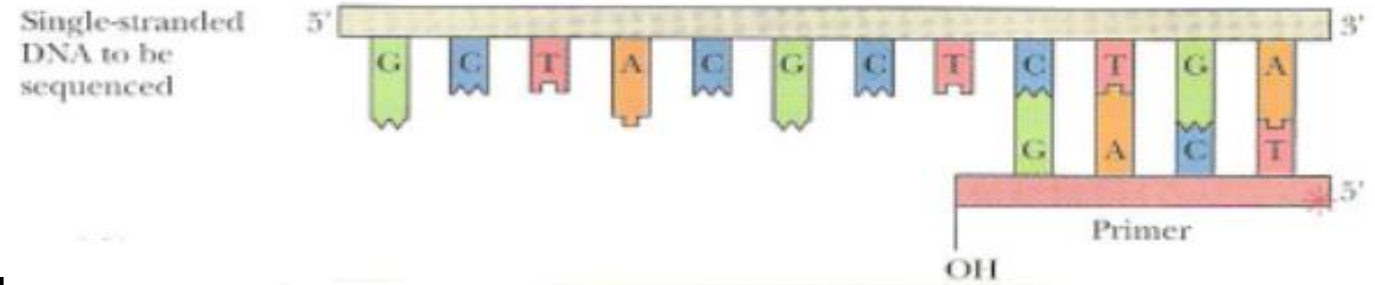
Мұнда реакциялық қоспада қосымша ретінде төрт 2',3'-дидезоксинуклеозидтрифосфатардың (ddATP, ddTTP, ddCTP немесе ddGTP) бірі болады. Бұл нуклеотид ДНҚ молекуласының синтезіне қатысады, алайда ары қарай синтез тоқтайды. Реакциялық қоспадағы dNTP/ddNTP концентрациялары әртүрлі болады.

Бұл реакция 4 пробиркада жүзеге асады. Осыдан алынған өнімдер полиакриламидті электрофорезде ажыратылады және нуклеотидтер тізбектері анықталады.

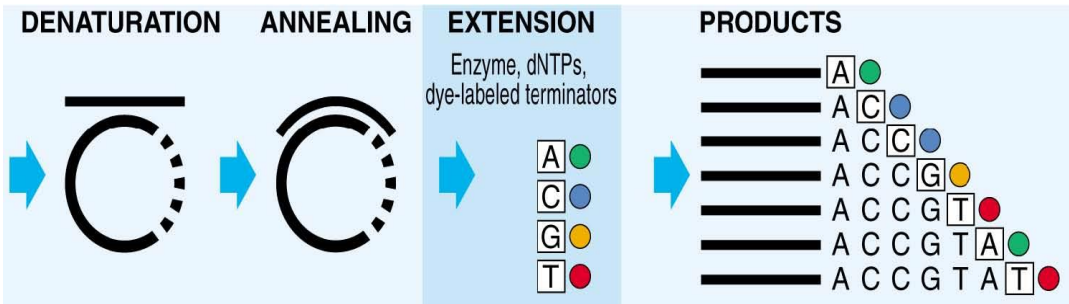


# Сэнгер әдісі

- ddNTP- 2',3'-дидеоксинуклеотид
- 3' гидроксил группасы жок
- ДНК-полимераза ферменті қолданылады



# Сэнгер әдісі



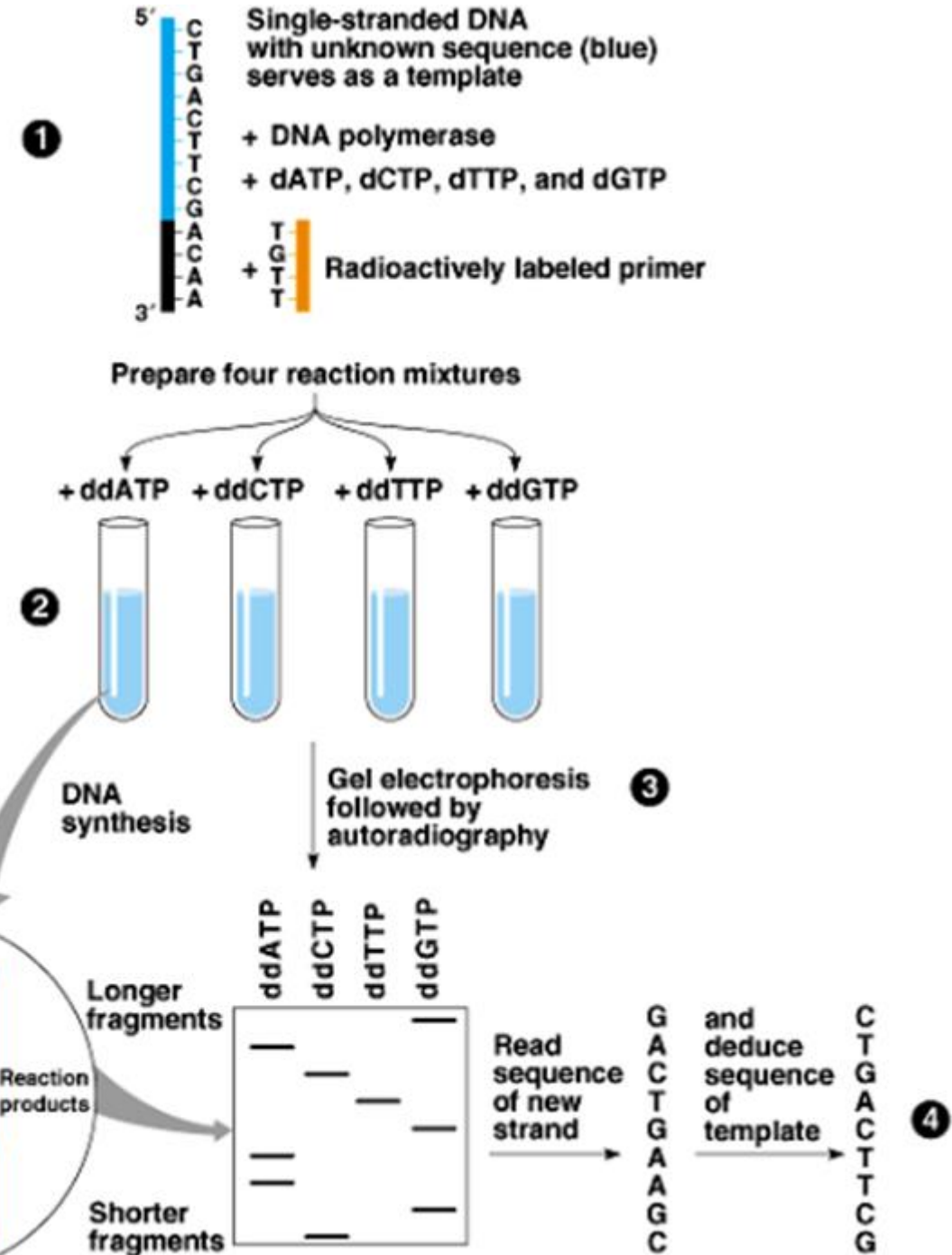
Кезеңдері:

Денатурация

Праймерлердің байланысуы және негіздердің ұзаруы

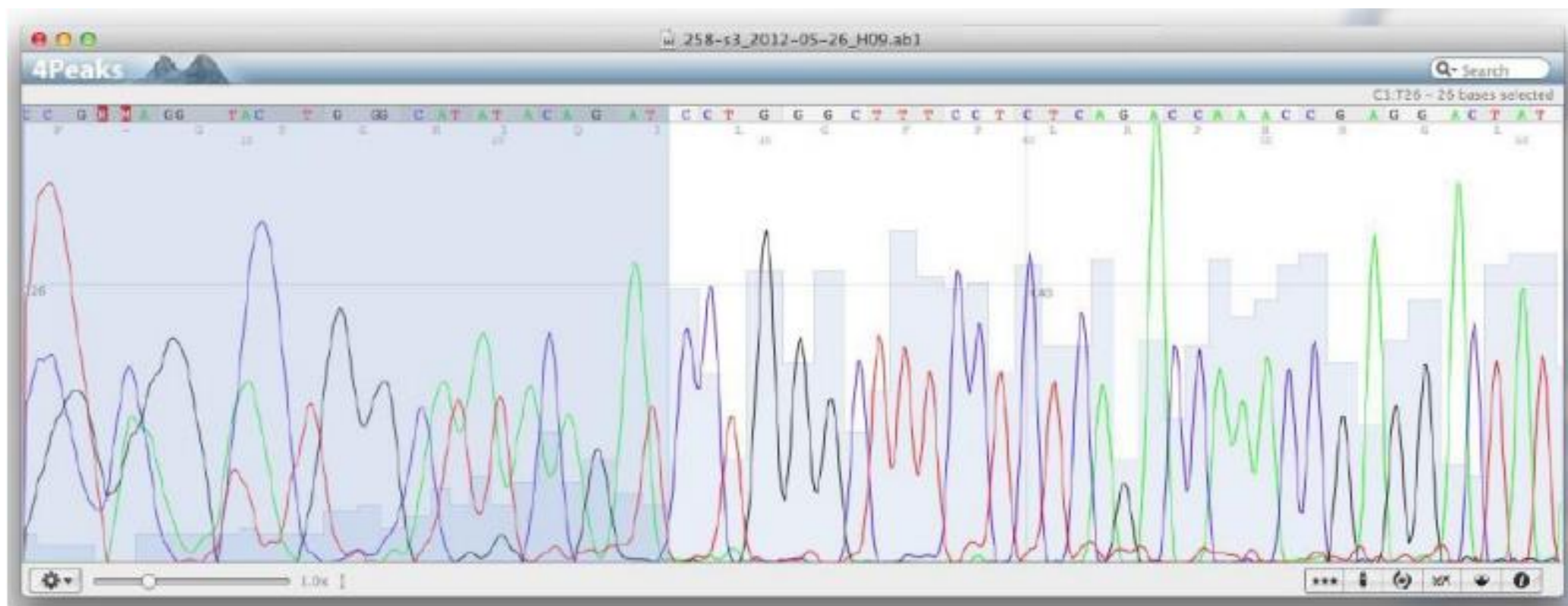
Терминация

Гель электрофорез



# Сэнгер әдісінің кемшіліктері

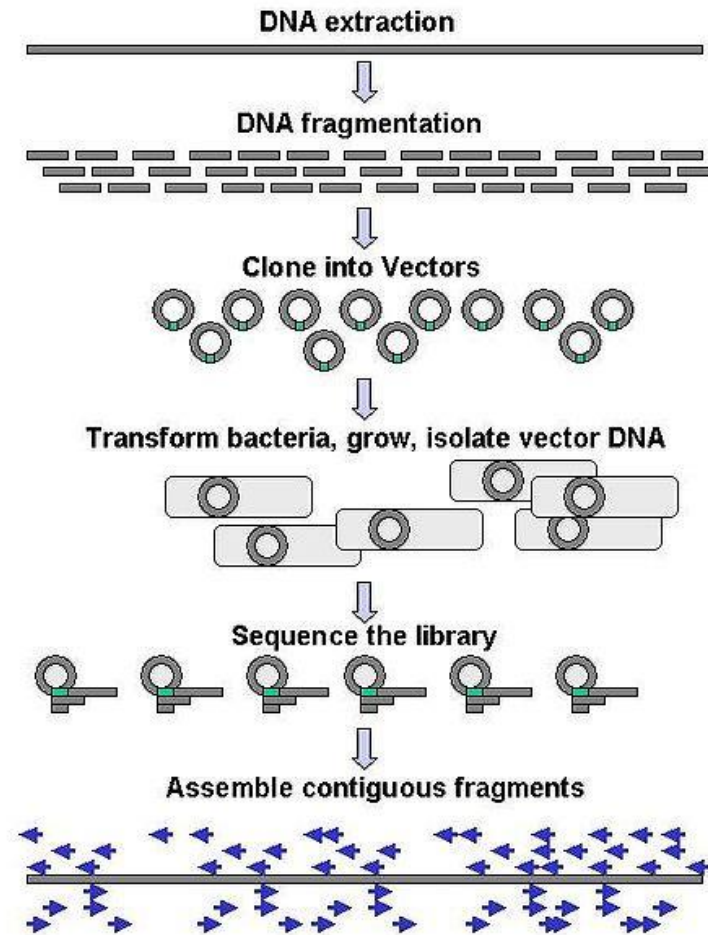
- 900-1000bp
- Қымбат
- Көп уақыт жұмсалады
- Алғашқы 40 нуклеотид оқылмайды



# Шотган әдісі

Толық геномды секвенирлеуге арналған

- Қадамдар:
  - ДНК-ны кездейсоқ кішкентай фрагменттерге бөлінеді
  - Дидеокси әдісімен фрагменттер оқылады
  - Бір-бірімен жабылатын фрагменттер оқылып қайта біріңғай ұзын тізбекке жиналады



Strand	Sequence
Бірінші шотган секвенсі	AGCATGCTGCAGTCATGCT----- -----TAGGCTA
Екінші шотган секвенсі	AGCATG----- -----CTGCAGTCATGCTTAGGCTA
Біріңғай ұзын тізбек	AGCATGCTGCAGTCATGCTTAGGCTA



Қазіргі кезде автоматтандырылған секвенаторлар осы «терминатор» әдісінің жетілдірілген түрін қолданады. ПААГ электрофорезінің орнына капилярлы электрофорез қолданылады және сигналдарды арнайы детекторлар арқылы суперкомпьютерлер тіркейді. Нуклеотидтер флуоресцентті бояғыштар арқылы белгіленеді және реакцияны бір пробиркада жүзеге асыруға болады.

# Қазіргі кезде ДНҚ молекуласын секвенирлеудің бірнеше әдістемесі бар

- ДНҚ молекуласын секвенирлеу: «плюс-минус» әдіс (Сэнгер)
- ДНҚ молекуласын секвенирлеу: «терминатор» әдіс (Сэнгер)
- **Секвенирлеудің «екінші кезеңіне» жататын әдіс - next-generation sequencing (NGS)**
- Пиросеквенирлеу
- Ионды жартылай өткізгішті секвенирлеу
- Бір молекулаға негізделген секвенирлеу

Соңғы он жылда ДНҚ молекуласын секвенирлеудің жаңа әдістері ойластырылуда. Негізгі мақсат, әдісті мейлінше қолжетімді ету, қолданылатын жабдықтарды кішірейту және кететін шығындарын азайту.

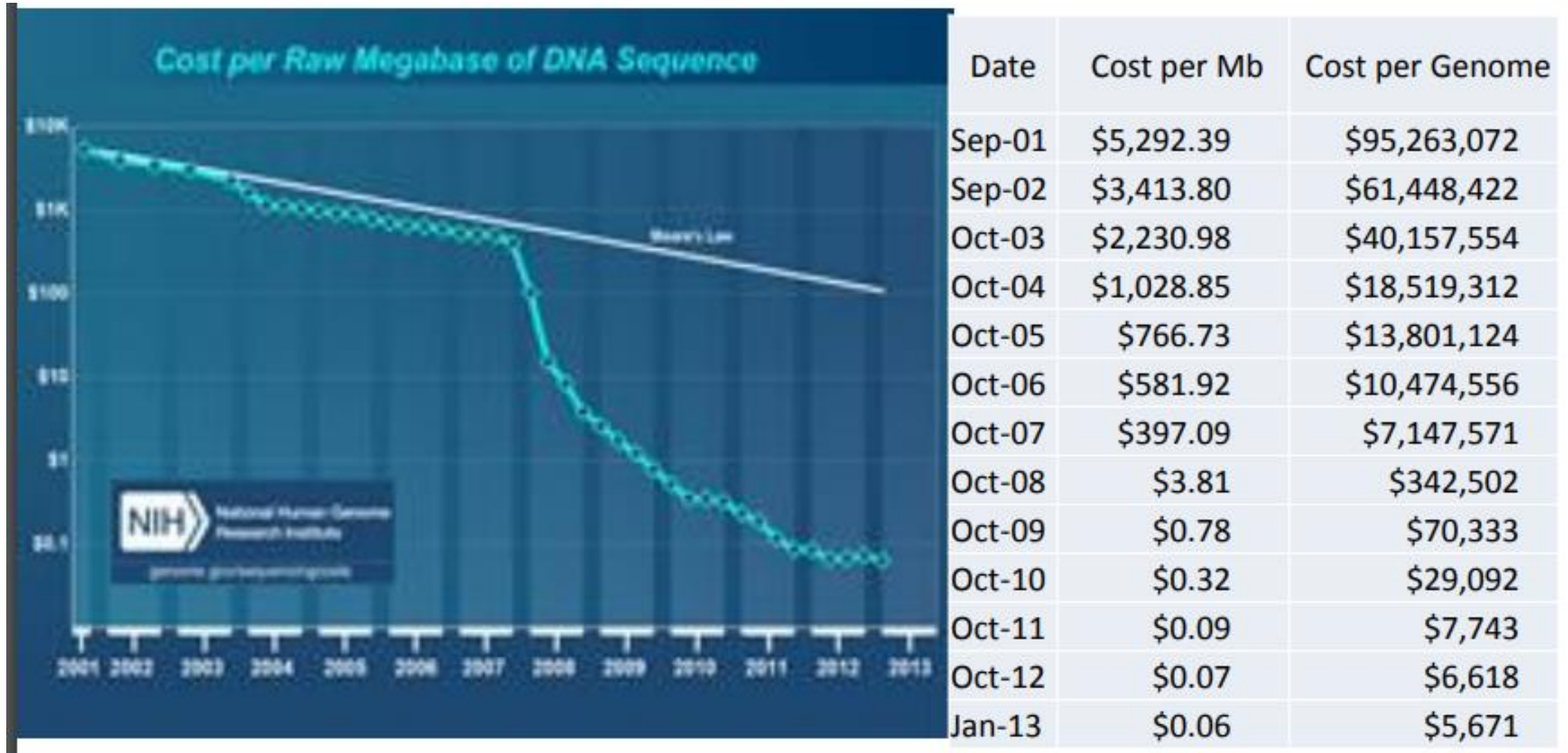
NGS секвенирлеу әдісі зерттелетін организмнің геномын секвенирлеуді жылдамдатты және салыстырмалы түрде арзандатты.

Одан бөлек, бірмезетте көптеген гендердің жұмысын анықтауға, яғни экспрессиясын бақылауға, гендердің активтіліктерін анықтауға мүмкіндік туды. Қазіргі кезде осындай жұмыстарды атқаратын секвенаторлар белгілі. Олар коммерциялық түрде шығарылады: Illumina, Thermo Fisher Scientific, Pacific Biosciences и Oxford Nanopore Technologies. Кейбір құралдар көптеген ғылыми орталықтарда қолданылады. Кейбіреулері әлі қарастырылу үстінде. Мысалы, Oxford Nanopore Technologies.



**Секвенирлеудің «екінші кезеңіне» жататын әдіс - next-generation sequencing (NGS)** - бастапқы құрылымының сипаттамасын алу үшін ДНҚ мен РНҚ-ның нуклеотидтік ретінанықтайтын әдістер тобы. Жаңа буынның секвенирлеу әдістерінің технологиясы геномның бірнеше бөлігін бір уақытта «оқуға» мүмкіндік береді, бұл алдыңғы секвенирлеу әдістерінен басты айырмашылығы болып табылады. NGS полимераза ферментімен катализденетін тізбектің ұзарып өсуі циклдарының қайталануы мен/ немесе олигонуклеотидтердің бірнеше рет байланысу циклдарының көмегімен жүзеге асырылады. NGS бір жұмыс циклінде нуклеотидтер тізбегінің жүздеген мегабазалары мен гигабазалары түзілуі мүмкін

# NGS технологиялары дамуымен геном сиквенсінің құнының өзгеруі



## next-generation sequencing (NGS) әдістерін салыстыру

метод	принцип	максимальная длина прочтения, пар оснований	стоимость секвенирования 1 млн пар оснований	стоимость секвенатора	время работы за цикл	количество прочтений за цикл	преимущества	недостатки
454 Life Sciences	пиросеквенирование и люцифераза	1000	\$10	\$500 000	7 часов	1 000 000	длина прочтённых геномных участков; скорость	стоимость; погрешность
Illumina-SOLEXA	нуклеотиды с флуорофором и снимаемыми терминаторами	300	\$0,05—0,15	\$1 000 000 - (NovaSeq 6000) \$100 000 - (MiSeq)	4 часа — 55 часов	до 5 000 000 000	эффективность, стоимость	скорость
SOLiD	лигирование олигонуклеотидных зондов с флуорофором	75	\$0,13	\$595 000	до 10 дней	до 2 400 000 000	стоимость	скорость
Helicos	нуклеотиды с флуорофором и снимаемыми терминаторами	2900	\$2	\$1 350 000	1 час	35 000—75 000	длина прочтённых геномных участков; скорость	низкая производительность при желаемой малой погрешности; стоимость
IonTorrent	изменение pH в процессе присоединения нуклеотидов	600	\$1	\$50 000	3 часа	до 5 000 000	стоимость; скорость	погрешность
PacBio Sequel <sup>[9]</sup>	нуклеотиды с флуорофором	20 000	\$2	\$600 000	20—30 часов	До 500 000	длина прочтений, точность	количество материала, цена
MinION Mk1B <sup>[10][11]</sup>	изменение силы тока по мере прохождения цепи через нанопору	длина всей НК, до 2 000 000	\$0,47—0,90	\$1000	1 мин — 2 суток	—	длина прочтений, стоимость, отсутствие амплификации и сложных химических превращений	погрешность

# Пиросиквенирлеу әдісі

- «Синтездеу арқылы секвенирлеу» қағидасына негізделген әдіс.
- Синтезделетін тізбекке нуклеотид енгізілген кезде босап шыққан пирофосфаттардың детекциясы жасалады.
- Технологияны Пол Нирен және оның шәкірті Мұстафа Ронаги Корольдік Технологиялық Институтында (Стокгольм) 1996 ж. жасаған.
- Артықшылығы:
  - Дәл нәтижелі әдіс
  - Автоматандырылған
  - Танбаланған праймер мен нуклеотидтердің қажжетілігін жояды
  - Гель электрофорез қадамы керегі жоқ

# Пиросеквенирование эдиси

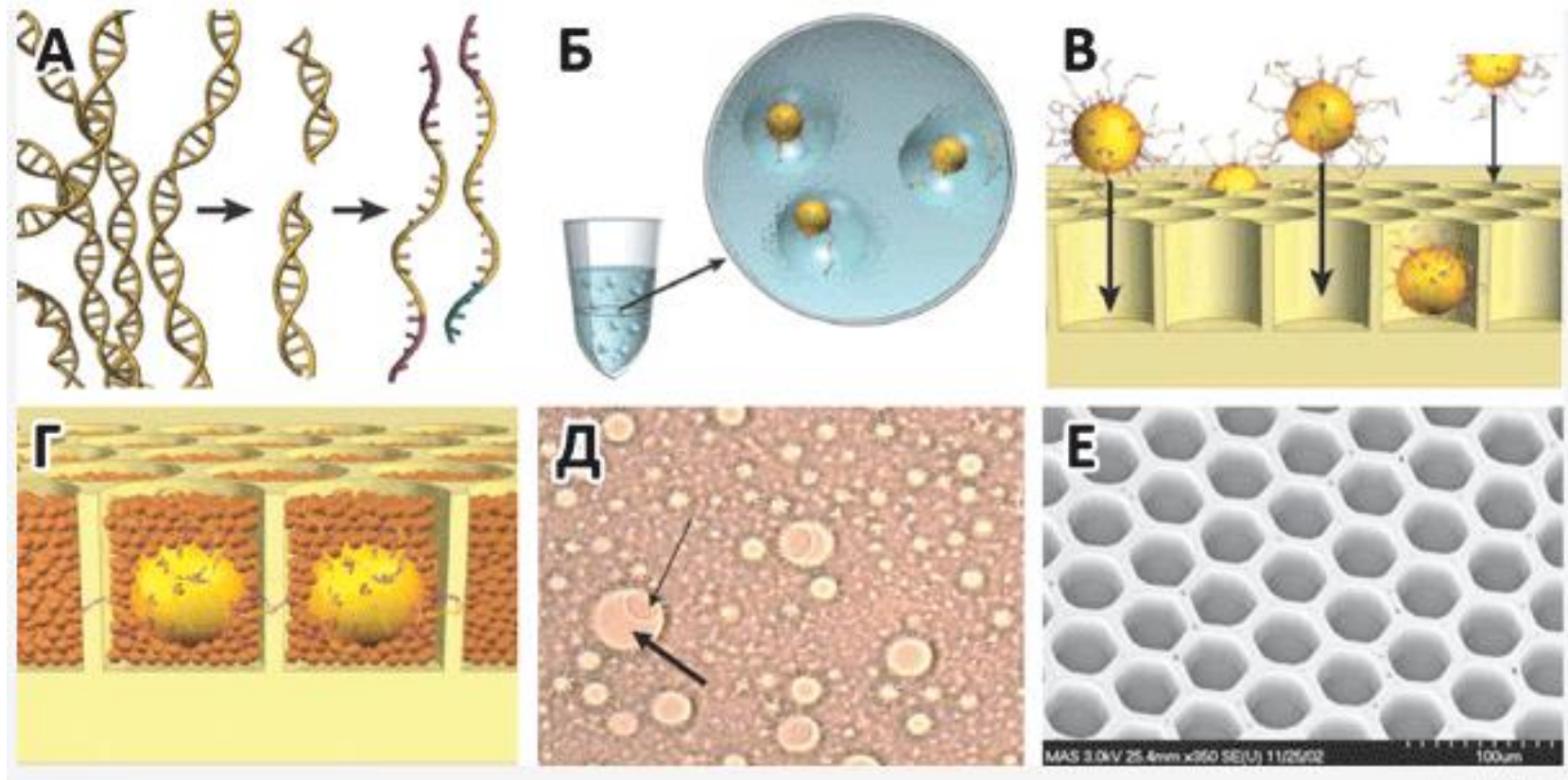
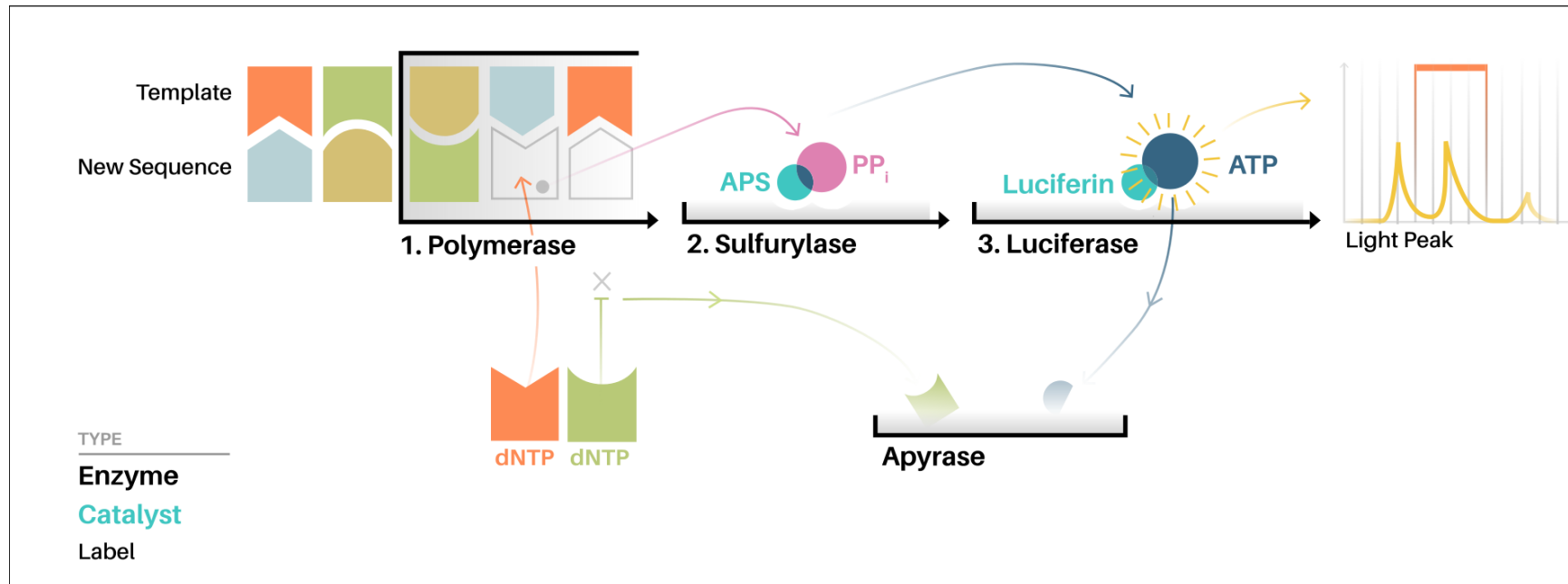


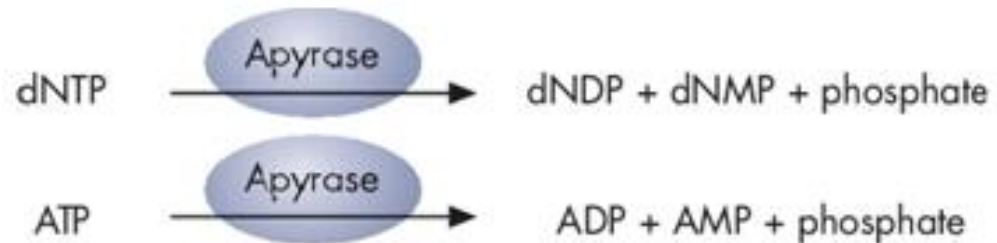
Рисунок 2. Схема пиросеквенирования. А — ДНК фрагментируется, к фрагментам пришиваются олигонуклеотиды-«адаптеры»; полученные двуцепочечные молекулы ДНК разделяются на две комплементарные цепи. Б — Одноцепочечные молекулы ДНК прикрепляются к бусинкам в условиях, стимулирующих попадание лишь одной молекулы на бусинку. Отдельные бусинки заключаются в капли реакционной смеси, окруженные маслом. Количество молекул на бусинке увеличивается в миллионы раз в результате эмульсионной полимеразной цепной реакции (эПЦР). В — Эмульсия разбивается, и цепи ДНК-фрагментов, образовавшиеся в результате эПЦР, разделяются. Бусинки, несущие на своей поверхности миллионы одноцепочечных копий первоначального фрагмента ДНК, помещаются в лунки оптико-волоконного слайда, по одной в каждую лунку. Г — В каждую лунку добавляются бусинки поменьше, несущие на своей поверхности ферменты, необходимые для пиросеквенирования. Д — Микрофотография эмульсии, изображающая «пустые» капли и капли, содержащие бусинки с ДНК-матрицей. Толстая стрелка указывает на 100-мкм каплю, тонкая — на 28-мкм бусинку. Е — Микрофотография фрагмента оптико-волоконного слайда, полученная при помощи сканирующего электронного микроскопа. Видна плакировка оптических волокон и пустые лунки.

# Пиросиквенирлеу әдісі

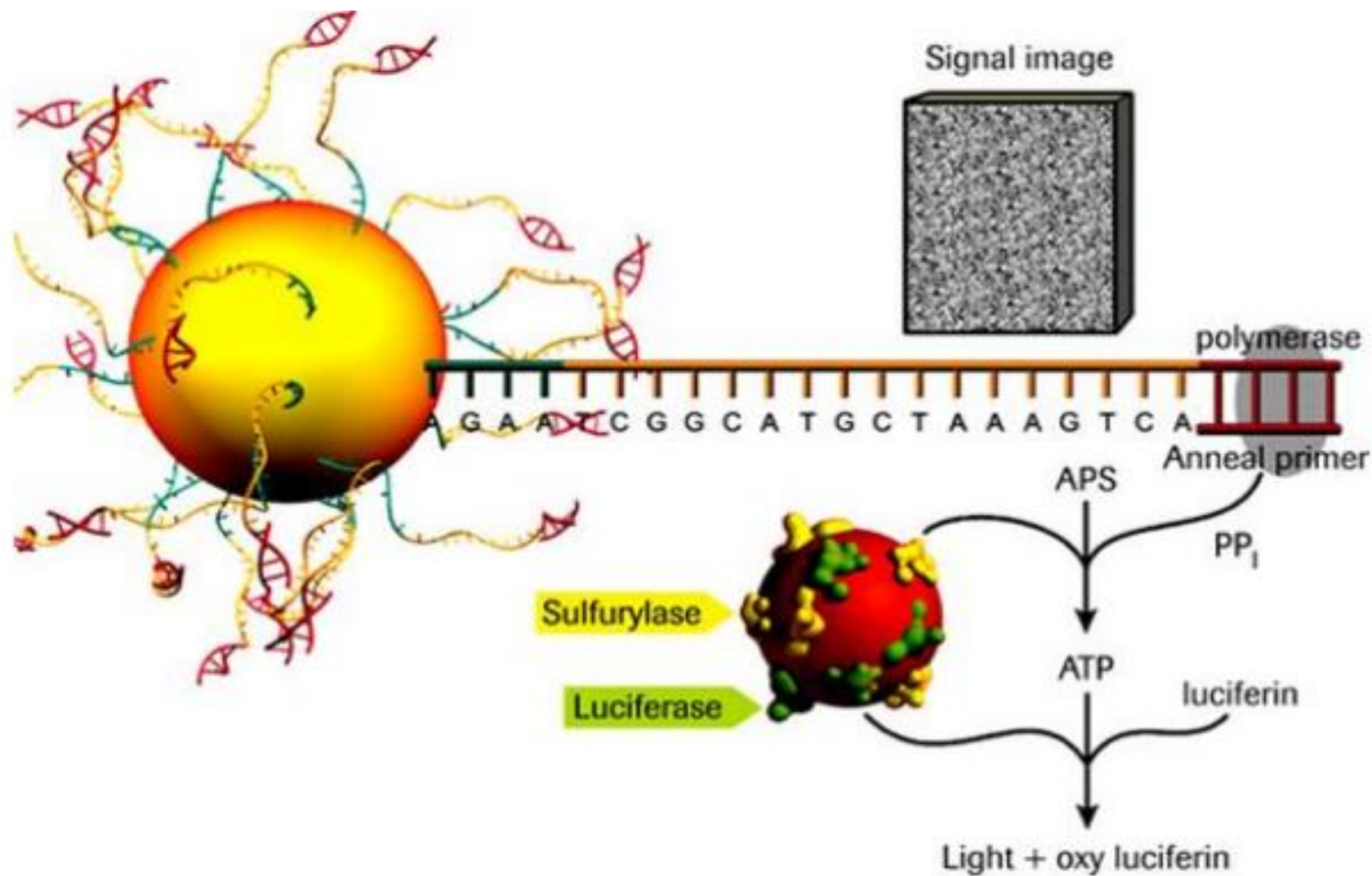
- 3 энзим
- + 2 субстрат (аденозин-5'-фосфосульфат және люцеферин)



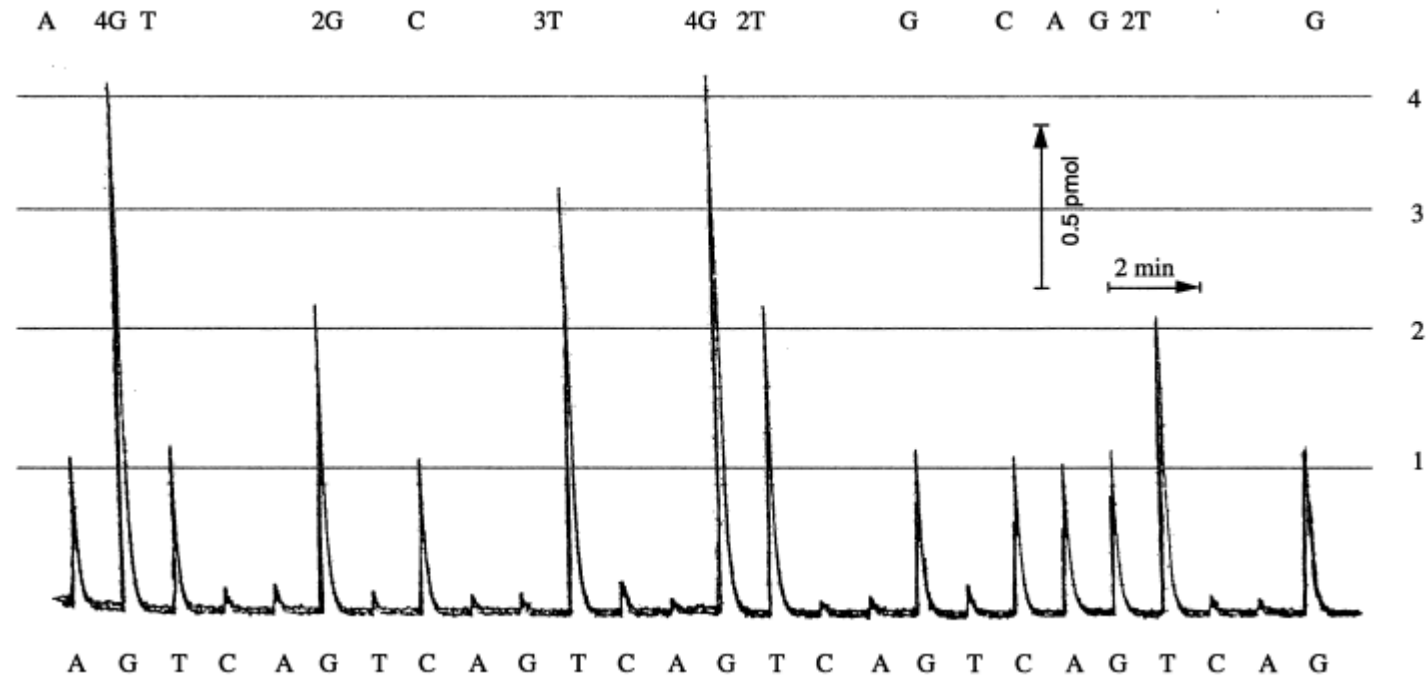
- + апираза (нуклеотидтерді дегдарадияға ұшыратын энзим)



# Пиросиквенирлеу әдісі

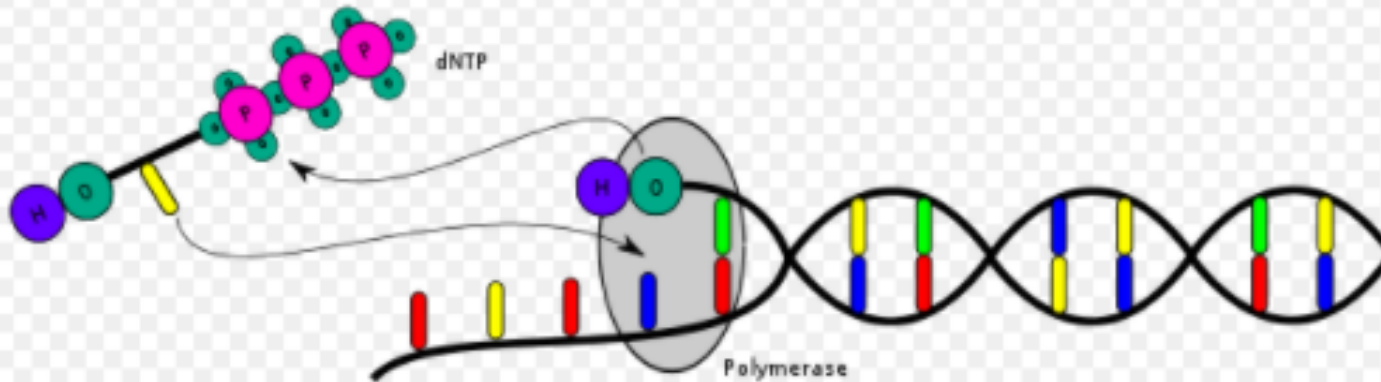


# Пиросиквенирлеу әдісінің нәтижесінің мысалы:

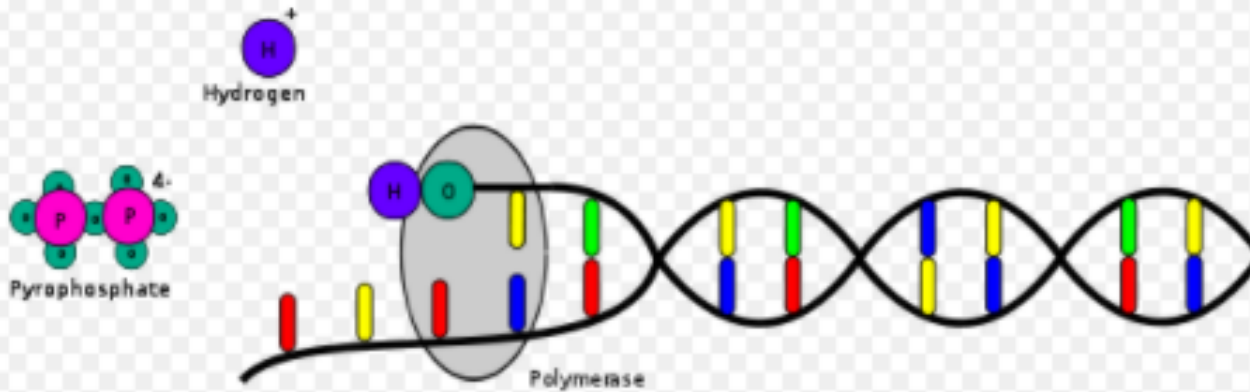




## Ионды жартылай өткізгішті секвенирлеу



Polymerase integrates a nucleotide.

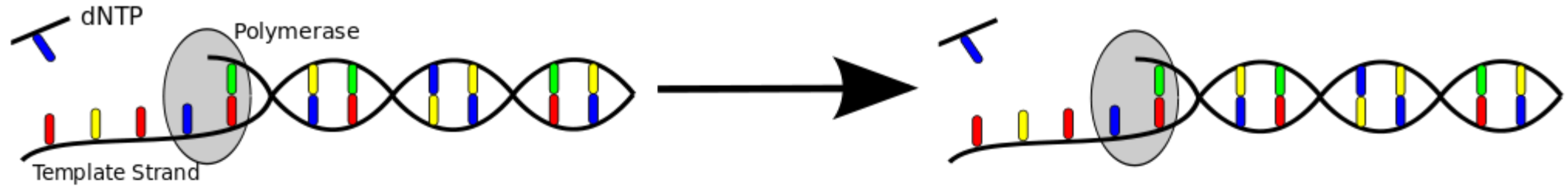


Hydrogen and pyrophosphate are released.

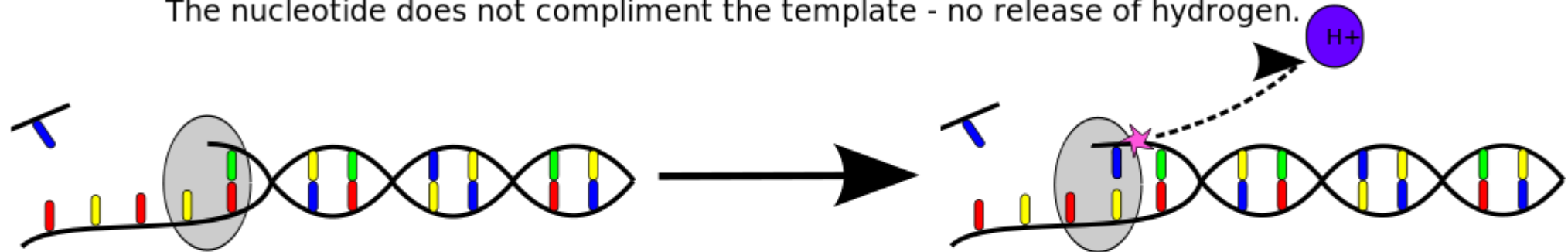
Ion Torrent компаниясының шығарған секвенирлеу әдісі.

Мұнда секвенирлеу үшін жартылай өткізгішті микрочиптер қолданылады. Қолданылу өте қарапайым және секвенирлеу негізінен реакциялық ортадағы ДНҚ-полимераза ферментінің жұмысындағы рН өзгерісіне негізделген

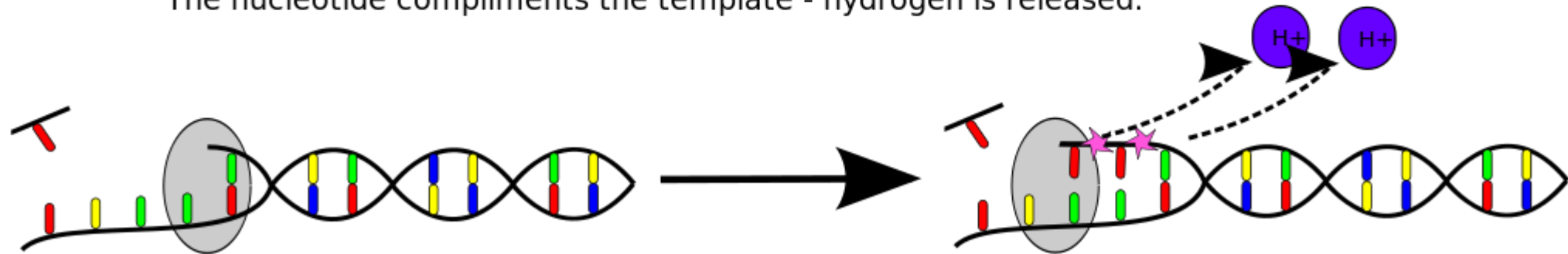
# Бөлінген сутек иондарының мөлшері тізбекке қанша нуклеотид енгізілгенін көрсетеді.



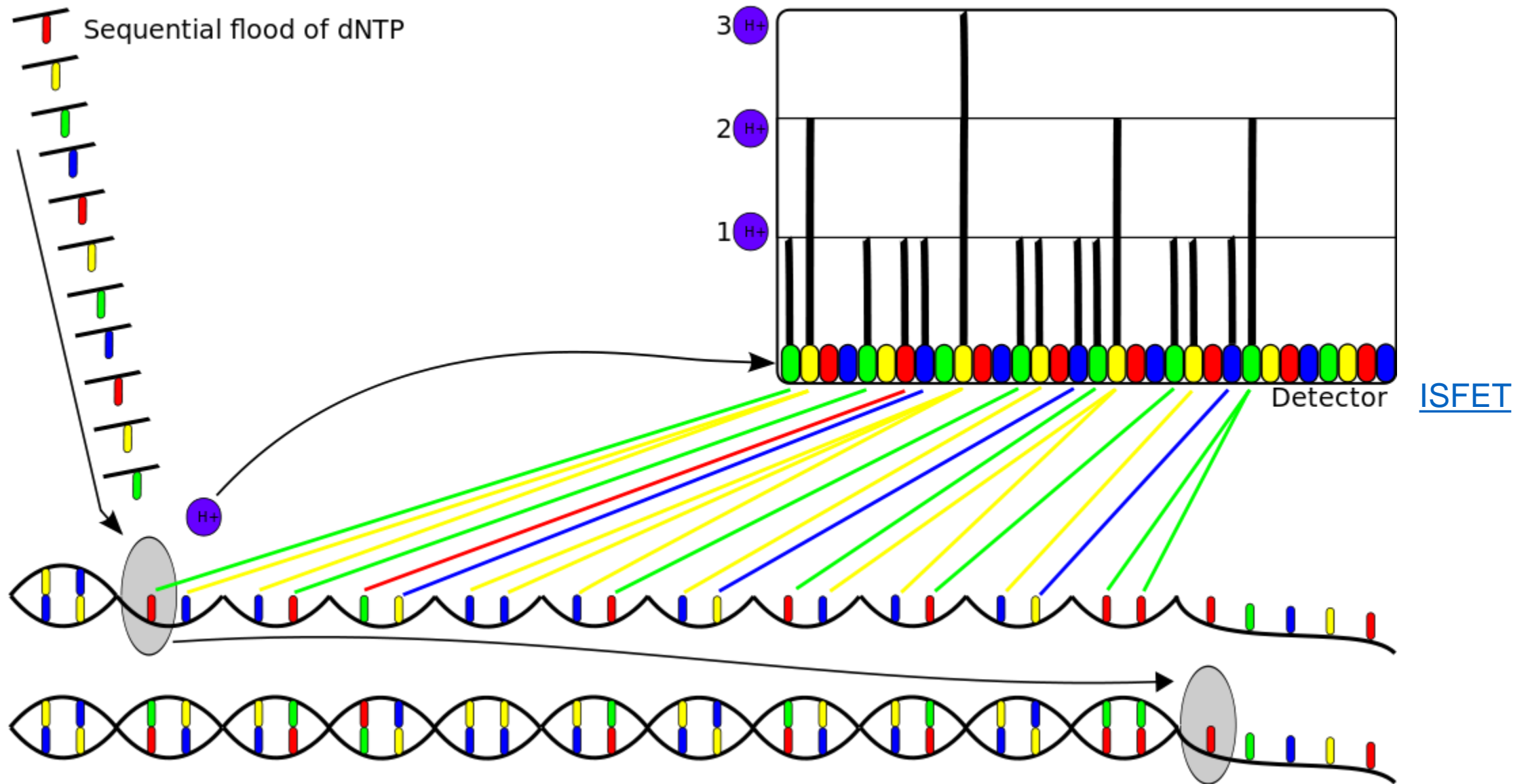
The nucleotide does not compliment the template - no release of hydrogen.



The nucleotide compliments the template - hydrogen is released.



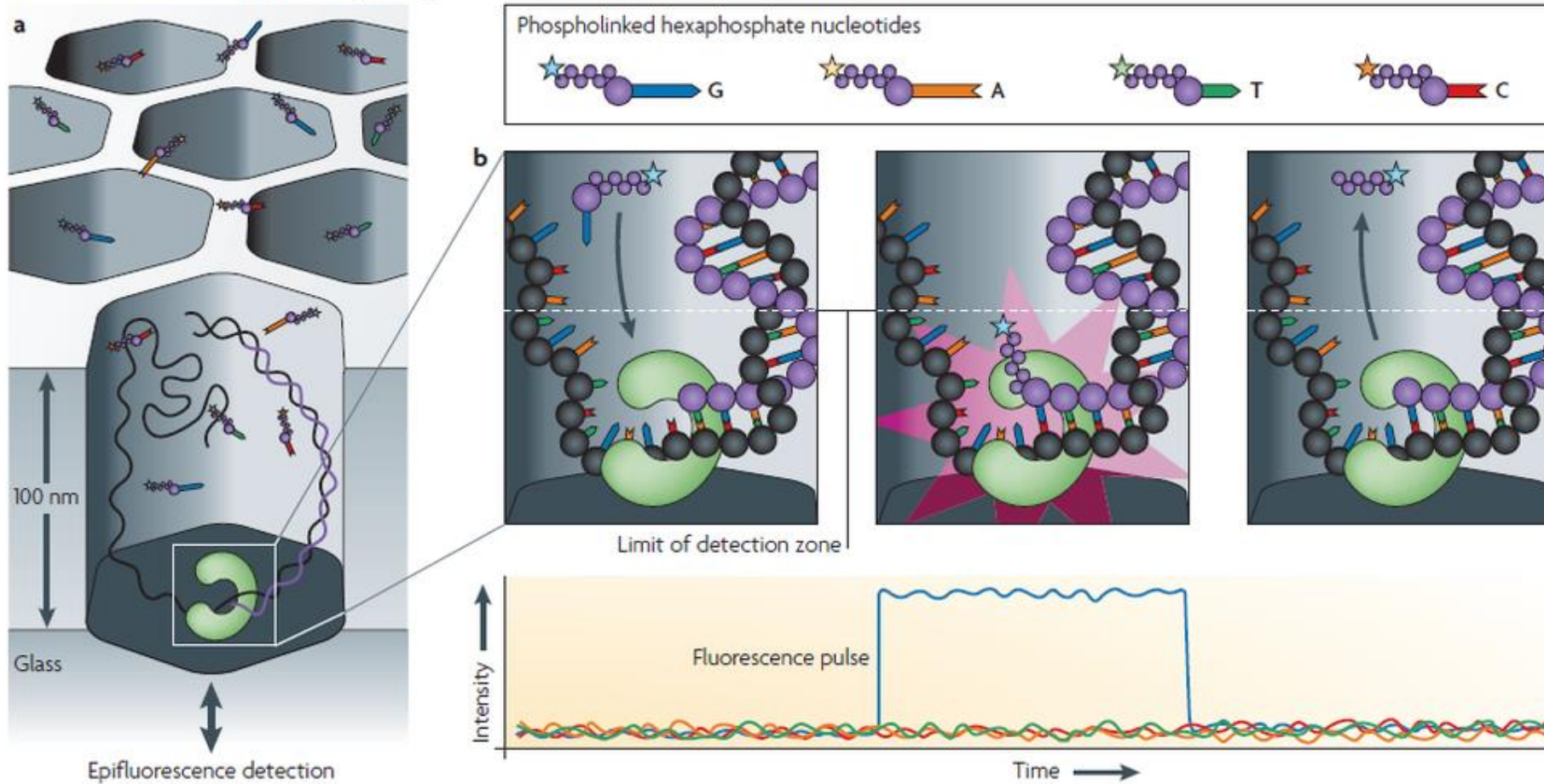
The nucleotide compliments several bases in a row - multiple hydrogen ions are released.



Бөлінген сутек иондары құрылғының датчиктері арқылы анықталады. Бірнеше нуклеотидтердің қатар кіруі босап шығатын иондар мөлшерінің артуына және сәйкесінше сигнал қарқындылығының өсуіне әкеледі.

# Бір молекулаға негізделген секвенирлеу

Pacific Biosciences — Real-time sequencing



SMRT-  
секвенирлеу  
(single molecule  
real time  
sequencing)  
**Pacific Biosciences**  
КОМПАНИЯСЫ  
ұсынған  
ТЕХНОЛОГИЯ.

Әдістің идеясы - нақты уақыт режимінде бір ДНҚ полимераза молекуласының жұмысын бақылау арқылы ДНҚ тізбегінің бірізділігін анықтау. Бұл жағдайда ДНҚ-полимераза зерттелетін ДНҚ молекуласының екінші тізбегін әр түрлі флуоресцентті белгілермен таңбаланған нуклеотидтер көмегімен синтездейді; Осы белгілерді тіркеу арқылы нақты уақытта ДНҚ-полимеразаның жаңа тізбекке қайсы нуклеотидті енгізіп жатқанын түсінуге болады.

## Үшінші буынның секвенирлеу әдісі



## NGS секвенирлеу нәтижелерін қолдану

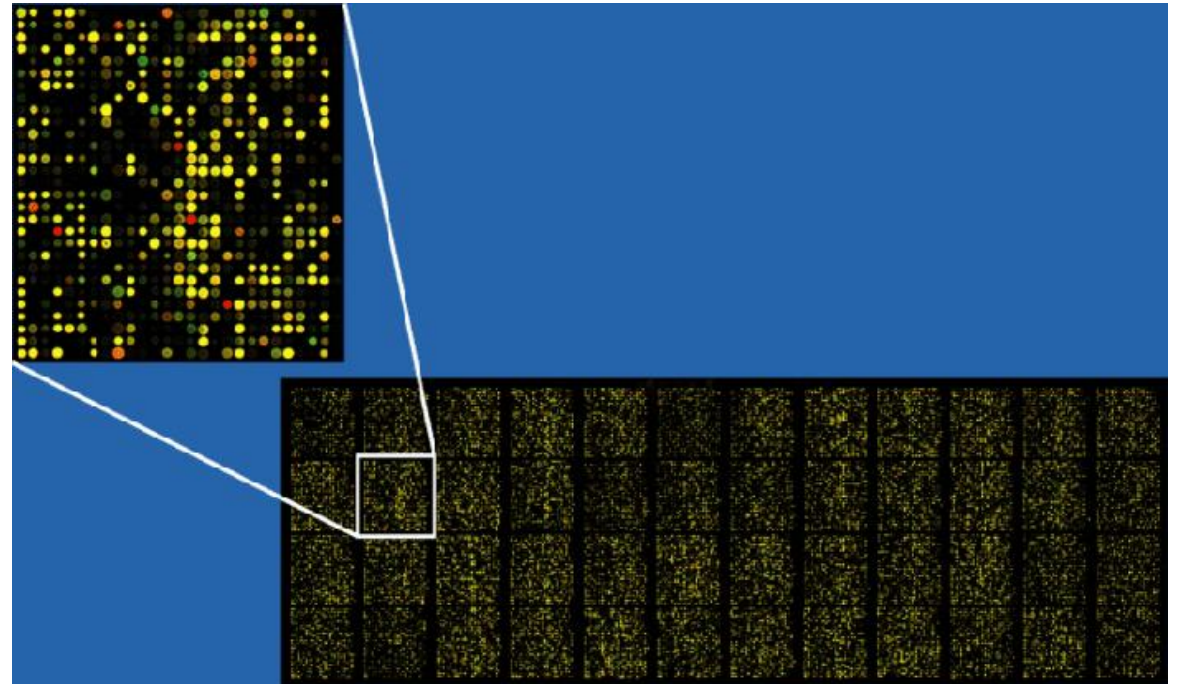
- 1. Толық геномды талдау** (оның ішінде ресеквенирлеу және *de novo* секвенирлеу).
- 2. РНҚ молекуласын секвенирлеу (RNA-Seq)**, гендердің экспрессиясын сапалық қана емес, сонымен бірге сандық жағынан бағалау үшін қолданылады. Сонымен бірге геннің кодтайтын және реттейтін бөліктерінің экспрессиясын жеке қарастыруға болады.
- 3. Метагеномды секвенирлеу** — әртүрлі үлгілердегі микроорганизмдердің әртүрлілігін зерттеуге бағытталған. Әртүрлі ортада болатын бактерияларды бағалауға, мысалы, адам ішегінде болатын микроорганизмдерді сипаттауда және т.б. жағдайларда қолданылады.
- 4. Таргетті секвенирлеу (экзомды секвенирлеу, митохондрия гендерін секвенирлеу, ампликондарды секвенирлеу)**. Зерттеушінің таңдап алған жеке гендерін секвенирлеу, немесе тек митохондрия гендерін секвенирлеу, Таргетті секвенирлеу жүргізілетін зерттеу жұмысының мақсатына байланысты тәжірибенің құнын мейлінше төмендетеді.

# ДНҚ микрочиптері

ДНҚ-микрочиптер – қатты матрицаның үстіне орналасқан қысқа ДНҚ молекуласының біртізбекті фрагменттері – (немесе оларды ДНҚ-зондтар деп те атайды).

Мұндай әрбір зонд белгілі бір нуклеотид тізбегінен тұрады және микрочипте өзінің орны болады.

Көпшілік жағдайда микрочиптер геннің экспрессиясын анықтауда қолданылады.



**Бір молекулаға негізделген секвенирлеу технологиясы  
туралы видео орналастырылған сайттар**

<https://nanoporetech.com/how-it-works>

<https://nanoporetech.com/how-it-works/what-happens>