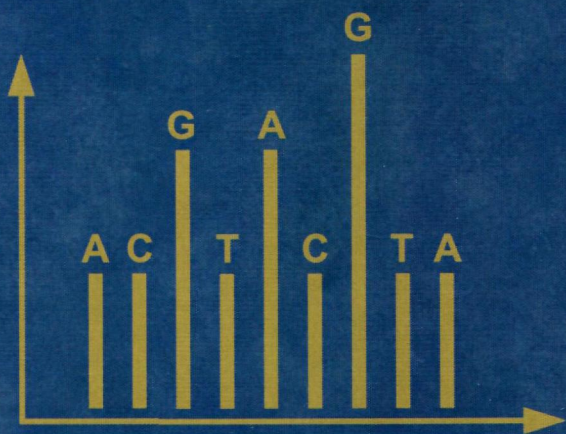


NGS

ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОЕ
СЕКВЕНИРОВАНИЕ



ИЗДАТЕЛЬСТВО

БИНОМ

УДК 577.21+616

ББК 28.04

N10

А в т о р ы:

Д. В. Ребриков, Д. О. Коростин, Е. С. Шубина,
В. В. Ильинский

NGS: высокопроизводительное секвенирование /
N10 Д. В. Ребриков [и др.] ; под общей редакцией Д. В. Ребрикова. — М. : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2014. — 232 с. : ил.

ISBN 978-5-9963-1784-4

Рассмотрены различные варианты и особенности современных методов определения структуры нуклеиновых кислот (методов секвенирования второго и третьего поколений). Описаны принципы наиболее популярных технологий высокопроизводительного секвенирования (NGS). Дана классификация высокопроизводительных методов секвенирования по нескольким параметрам. Приведены основные элементы первичного анализа данных масштабного секвенирования. Отдельные главы посвящены применению NGS для решения различных биологических задач: секвенирования про- и эукариотических геномов и транскриптомов, метагеномного секвенирования, использования NGS в медицинской практике.

Для сотрудников генно-инженерных и медицинских диагностических лабораторий, а также для преподавателей и студентов, специализирующихся в области молекулярной биологии и биотехнологии.

УДК 577.21+616

ББК 28.04

Научное издание

ов Денис Владимирович
тин Дмитрий Олегович
а Екатерина Сергеевна
ий Валерий Владимирович

NGS: ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ

Главный художник *И. Е. Марев*

Художественный редактор *Н. А. Новак*

Технический редактор *Е. В. Денюкова*. Корректор *Е. Н. Клитина*

Компьютерная верстка: *Л. В. Катуркина*

Подписано в печать 12.04.14. Формат 60×90/16.

Усл. печ. л. 14,5. Тираж 1200 экз. Заказ 2045

Издательство «БИНОМ. Лаборатория знаний»

125167, Москва, проезд Аэропорта, д. 3

Телефон: (499)157-5272, e-mail: binom@Lbz.ru, http://www.Lbz.ru

ISBN 978-5-9963-1784-4

© БИНОМ. Лаборатория знаний, 2014

Отпечатано способом ролевой струйной печати

в ОАО «Первая Образцовая типография» Филиал «Чеховский Печатный Двор»

142300, Московская область, г. Чехов, ул. Полиграфистов, д. 1

Сайт: www.chpd.ru, E-mail: sales@chpd.ru, т/ф. 8(496)726-54-10

ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие Е. Д. Свердлова	7
Предисловие М. С. Гельфанда	8
Предисловие авторов	9
Перечень компаний, упомянутых в тексте	11
Список сокращений	12
Глава 1. Обзор методов определения последовательности нуклеиновых кислот	13
1.1. Методы, основанные на детекции сигнала от множества одинаковых молекул ДНК (методы с предварительной амплификацией фрагментов ДНК) ..	14
1.2. Методы, основанные на детекции сигнала от одной молекулы ДНК (секвенирование одиночных молекул ДНК)	34
1.3. Другие методы секвенирования	40
Список литературы	40
Глава 2. Технологии создания библиотек фрагментов ДНК для NGS	43
2.1. Очистка нуклеиновых кислот для NGS	45
2.2. Оценка концентрации нуклеиновых кислот и полногеномная амплификация (WGA)	46
2.3. Способы разрушения ДНК для приготовления библиотеки	47
2.4. Оценка длин фрагментов ДНК	51
2.5. Присоединение адаптеров	52
2.6. Предварительная амплификация библиотеки	53
2.7. Отбор фракции фрагментов нужной длины (size-select) ..	53
2.8. Мечение смешиваемых образцов специфичными адаптерами («штрих-кодирование»)	56
2.9. Клональная амплификация фрагментов ДНК	57
2.10. Типы библиотек фрагментов ДНК для NGS	60
Список литературы	65

Глава 3. Коммерческие технологии высокопроизводительного секвенирования	66
3.1. Технология 454 Life Sciences компании Roche (эмульсионная ПЦП + пиросеквенирование)	66
3.2. Технология SOLiD компании Life Technologies Thermo Fisher Scientific (эмульсионная ПЦП + секвенирование лигированием)	69
3.3. Illumina Genome Analyser компании Illumina (мостиковая ПЦП + секвенирование синтезом)	71
3.4. Платформы Ion PGM и Ion Proton компании Life Technologies Thermo Fisher Scientific (эмульсионная ПЦП + полупроводниковое секвенирование)	74
3.5. Платформа PacBio компании Pacific Biosciences (секвенирование синтезом одиночных молекул)	78
3.6. Платформа Heliscope компании Helicos Biosciences (секвенирование синтезом одиночных молекул)	80
Список литературы	84
Глава 4. Общие принципы обработки данных NGS	85
4.1. Оценка качества первичных данных	85
4.2. Сборка геномов <i>de novo</i>	89
4.3. Алгоритмы сборки	91
4.4. Аппаратные и биологические особенности данных NGS	94
4.5. Объединение контигов в скэффолды	97
4.6. Вариации в близкородственных геномах	100
4.7. Картирование прочтений при повторном секвенировании	101
4.8. Поиск однонуклеотидного полиморфизма (SNP)	104
4.9. Поиск структурных вариаций: протяженных вставок, делеций, инверсий и транслокаций	105
4.10. Аннотация обнаруженных вариаций с использованием баз данных	106
4.11. Предсказание функциональных и клинически значимых изменений белка на основе обнаруженных мутаций	107
Список литературы	108
Глава 5. Оборудование и программные решения для обработки данных NGS	112
5.1. Локальные центры обработки данных NGS: архитектура и программные решения	112
5.2. Программное обеспечение для локального центра обработки данных NGS	116

5.3. Сетевые сервисы и простые решения для обработки данных NGS	117
5.4. Специализированные проекты по обработке данных NGS.....	120
Список литературы	121
Глава 6. Планирование эксперимента с использованием NGS	122
6.1. Общие принципы планирования биологических экспериментов.....	122
6.2. Рандомизация в NGS.....	123
6.3. Повторности в NGS	124
6.4. Основные типы ошибок при секвенировании.....	125
6.5. Варианты применения NGS	126
Список литературы	127
Глава 7. Секвенирование индивидуальных геномов и транскриптомов прокариот	128
7.1. Роль NGS в микробиологии	128
7.2. История секвенирования бактериальных геномов.....	129
7.3. Определение полной последовательности бактериального генома <i>de novo</i>	130
7.4. Пример протокола секвенирования образца бактериальной ДНК.....	132
7.5. Анализ данных геномного секвенирования бактерий	141
7.6. Секвенирование транскриптома прокариот.....	142
Список литературы	145
Глава 8. Исследование микробных сообществ методами NGS	146
8.1. Очистка ДНК для метагеномных исследований.....	147
8.2. Анализ микробного сообщества секвенированием ампликонов	148
8.3. Метагеномное секвенирование	151
8.4. Биоинформатический анализ данных метагеномного секвенирования.....	152
8.5. Комбинированный алгоритм анализа таксономического состава сообщества	154
8.6. Сравнение метагеномов между собой.....	155
8.7. Метатранскриптом	155
Список литературы	157

ГЛАВА 9. Секвенирование геномов эукариот.....	162
9.1. Общие аспекты секвенирования сложных геномов	162
9.2. Секвенирование эукариотических геномов <i>de novo</i>	164
9.3. Повторное секвенирование (ресеквенирование)	166
9.4. Фазирование при ресеквенировании диплоидных геномов	169
9.5. Секвенирование генома отдельной клетки	171
Список литературы	174
ГЛАВА 10. Секвенирование транскриптомов эукариот.....	176
10.1. Применение NGS для исследования РНК.....	176
10.2. Общие моменты очистки РНК и синтеза кДНК	178
10.3. Ферменты для обратной транскрипции.....	180
10.4. Подготовка библиотеки кДНК для NGS	182
Список литературы	188
ГЛАВА 11. Повышение концентрации определенных последовательностей в библиотеке для NGS (таргетное секвенирование).....	191
11.1. Параметры методов целевого обогащения.....	191
11.2. Обогащение библиотеки фрагментов ДНК только на основе ПЦР	192
11.3. Обогащение библиотеки фрагментов ДНК при помощи гибридизации с пробой.....	198
11.4. Обогащение при помощи гибридизации в растворе с отбором методом ПЦР (инвертированные молекулярные пробы)	201
11.5. Обогащение библиотеки белок-связывающими последовательностями хроматина (ChIP-Seq)	203
Список литературы	206
ГЛАВА 12. Применение высокопроизводительного секвенирования в медицинской практике	207
12.1. Генетическое тестирование с использованием NGS....	207
12.2. Исследование патогенов и микробиома человека.....	220
Список литературы	222
ГЛАВА 13. Перспективы высокопроизводительного секвенирования	223
Список литературы	227
Предметный указатель	228