

İLERİ ARAŞTIRMA YÖNTEMLERİ 56901007

2020-21 BAHAR

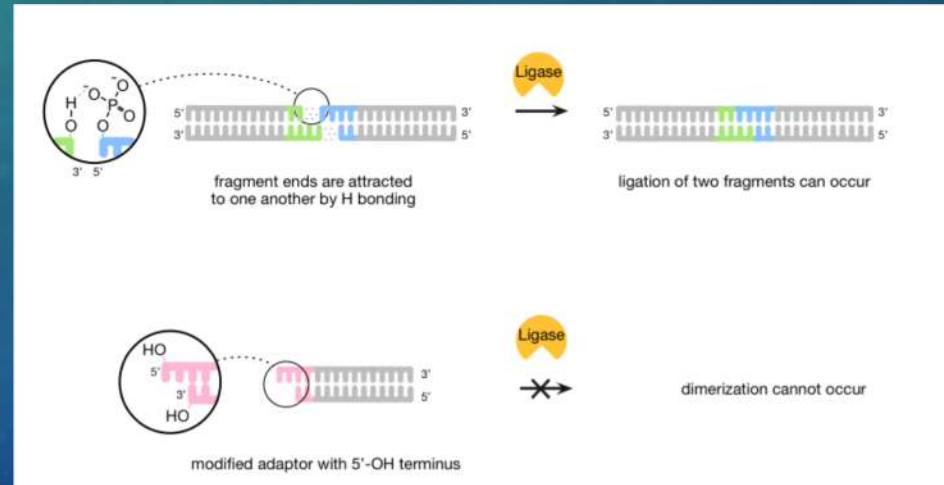
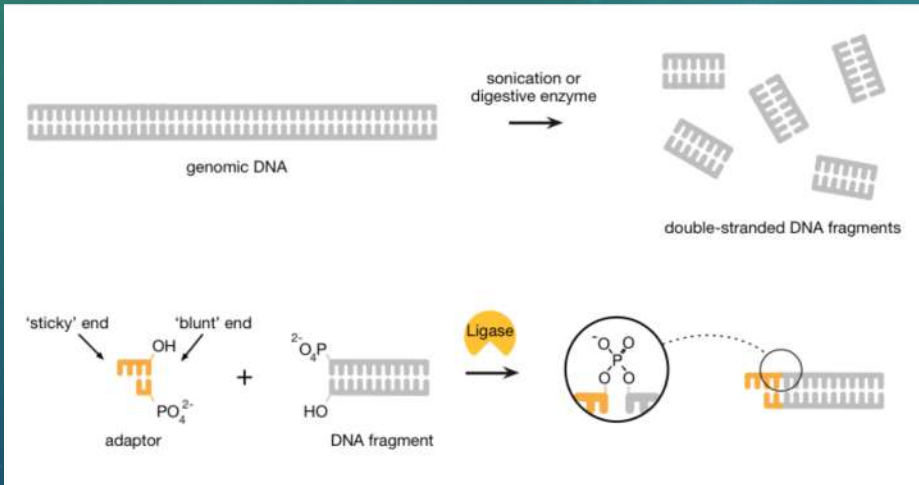
DR. GÜNSELİ ÇUBUKÇUOĞLU DENİZ

NEXT GENERATION SEQUENCING (NGS) YENİ NESİL SEKANSLAMA

- Tüm genom sekanslama
- Amplikon sekanslama
- Transkriptom sekanslama
- Tüm exom sekanslama (≈ 22000 kodlanan gen)
- Mitokondriyal sekanslama
- Metagenomiks

NGS TEMEL ADIMLAR-1

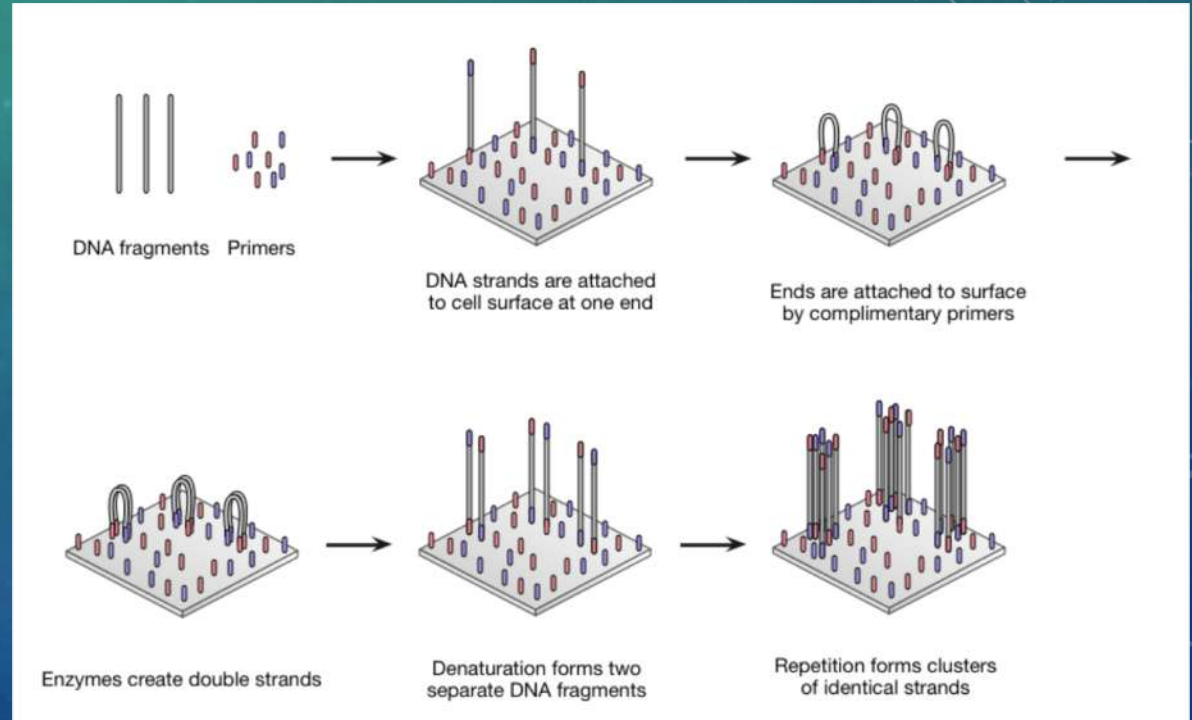
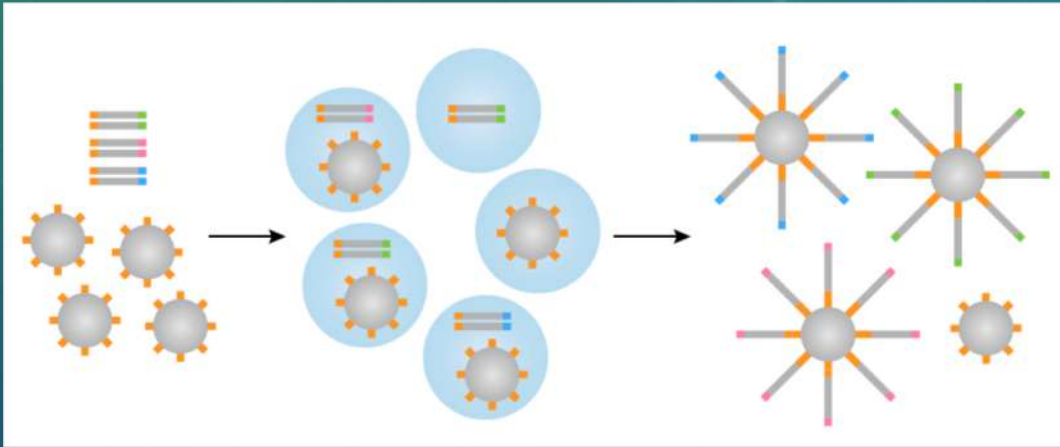
- Kütüphane hazırlama: Sonikasyonla veya enzimatik DNA fragmentasyonu
- Adaptör ligasyonu



NGS TEMEL ADIMLAR-2

- Amplifikasyon

Emülsiyon PCR ve Köprü PCR



NGS TEMEL ADIMLAR-3

- Sekanslama
- Veri analizi

NGS PLATFORMLARINDA KULLANILAN TEMEL TEKNİKLER

- Pirosekanslama
- Sentezle sekanslama
- Ligasyonla sekanslama
- İyon yarı-iletken sekanslama

ROCHE 454 GS FLX

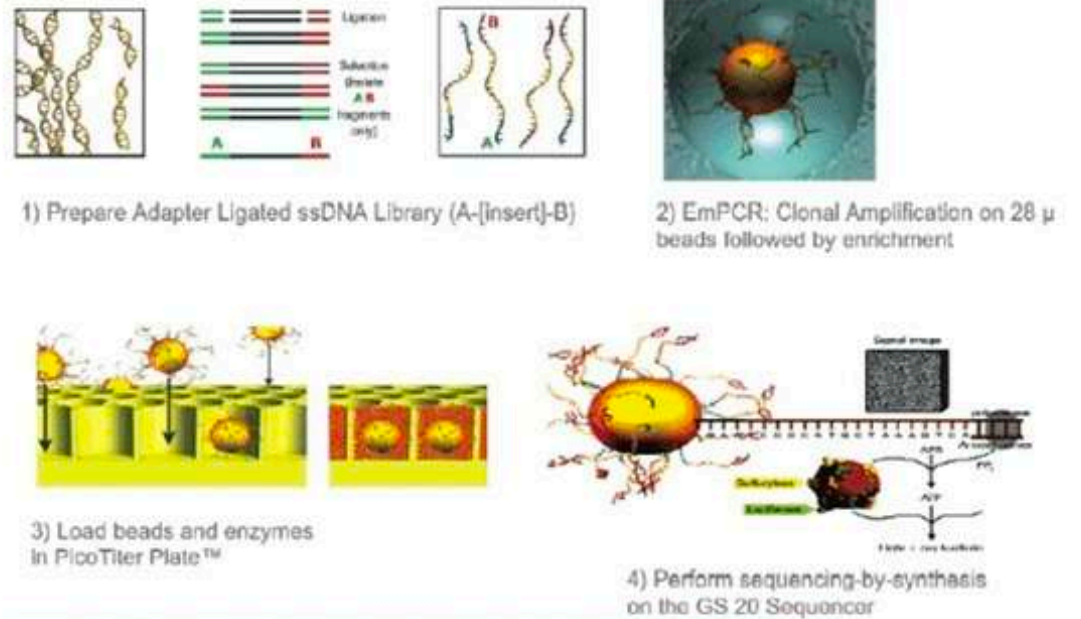


- ❖ İlk NGS (2005)
- ❖ pirosekanslama ve emülsiyon PCR
- ❖ DNA kütüphaneleri boncuklar üzerinde sabitlenir. Emülsiyon PCR aracılığıyla klonal amplifikasyonu sağlanır. Mikrokuyucuklar içindeki boncuklarda DNA molekülleri komplementariteye göre polimerize olurken kimyasal reaksiyonlarda spesifik enzimler kullanılır. ATP substrat olurken finalde açığa çıkan ışığın tespitiyle nükleotit dizisi okunur. (Geniş ölçekli pirosekanslama)
- ❖ Her run 400-600 Mb DNA okunabilir

DNA fragmentasyonu
Adaptörlerin ligasyonu
DNA fragmanlarının boncuklara atışmanı
Pikolitre plakada mikrokuyucuklar
içerisinde emülsiyon PCR ile amplifikasyon
Amplikonların pirosekanslanması ve
kemilüminesansın deteksiyonu

- Reaktif maliyeti yüksek
- Homopolimerlerden gelen yüksek hata oranı

Figure 1. Overview of the 454 sequencing system

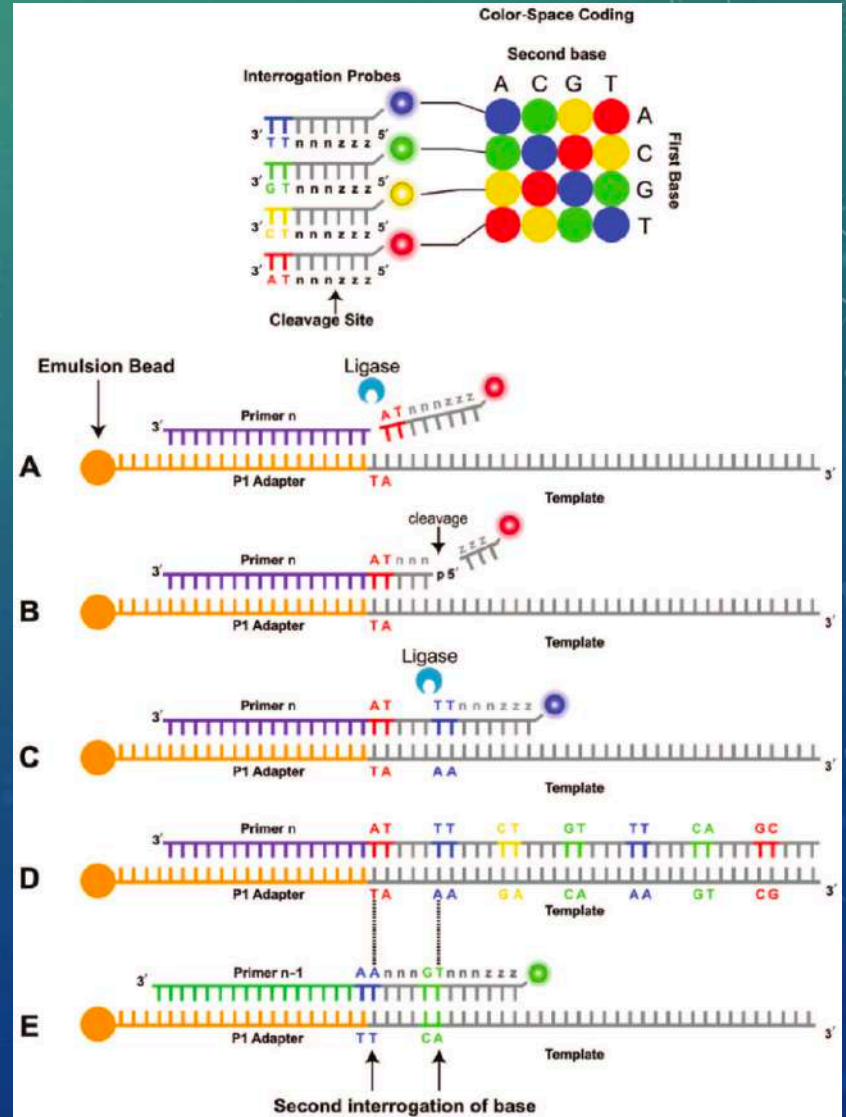


www.roche-applied-science.com

454 LIFE SCIENCES

- Yüksek doğruluk
- Kısa okumalar esas dezavantajı

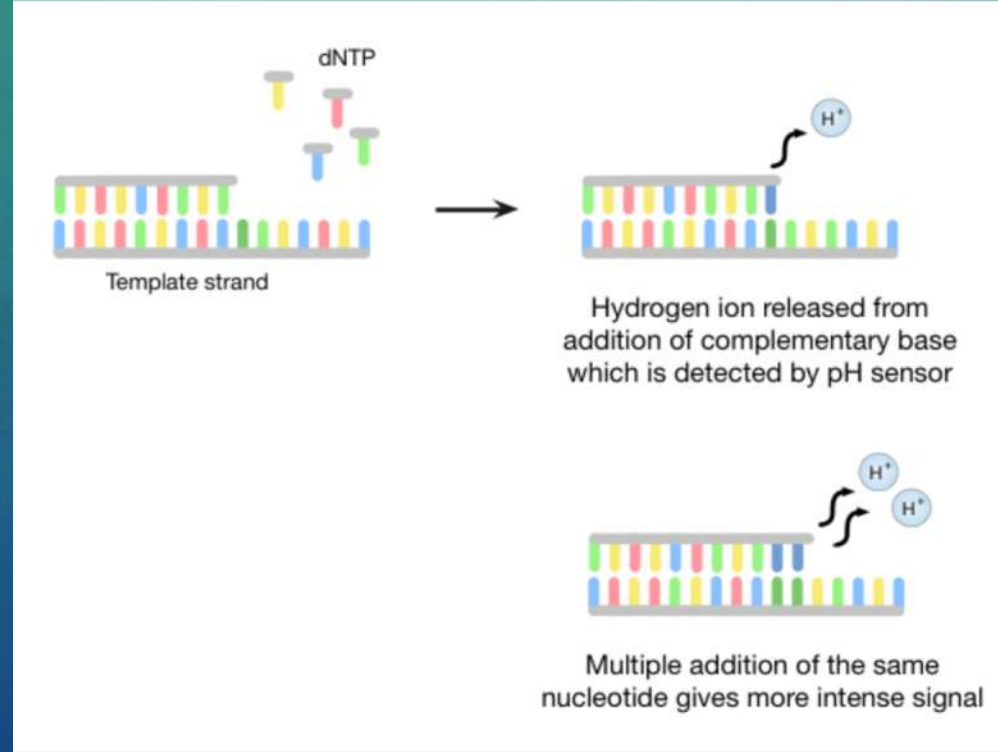
1 run yaklaşık 7 gün sürer ve 30 Gb veri üretilir



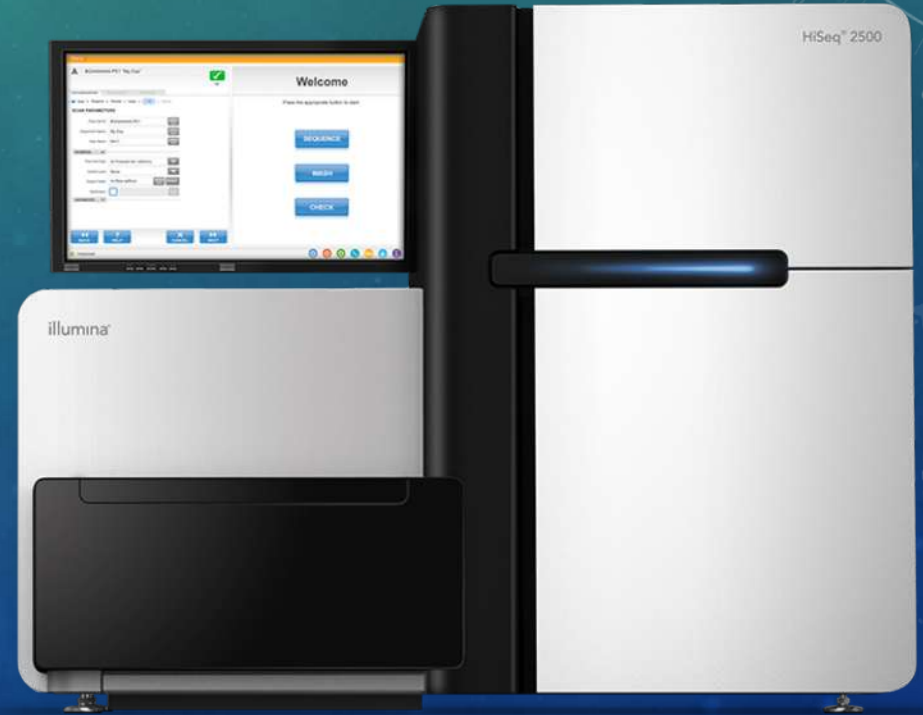
ION TORRENT NGS SİSTEMLERİ

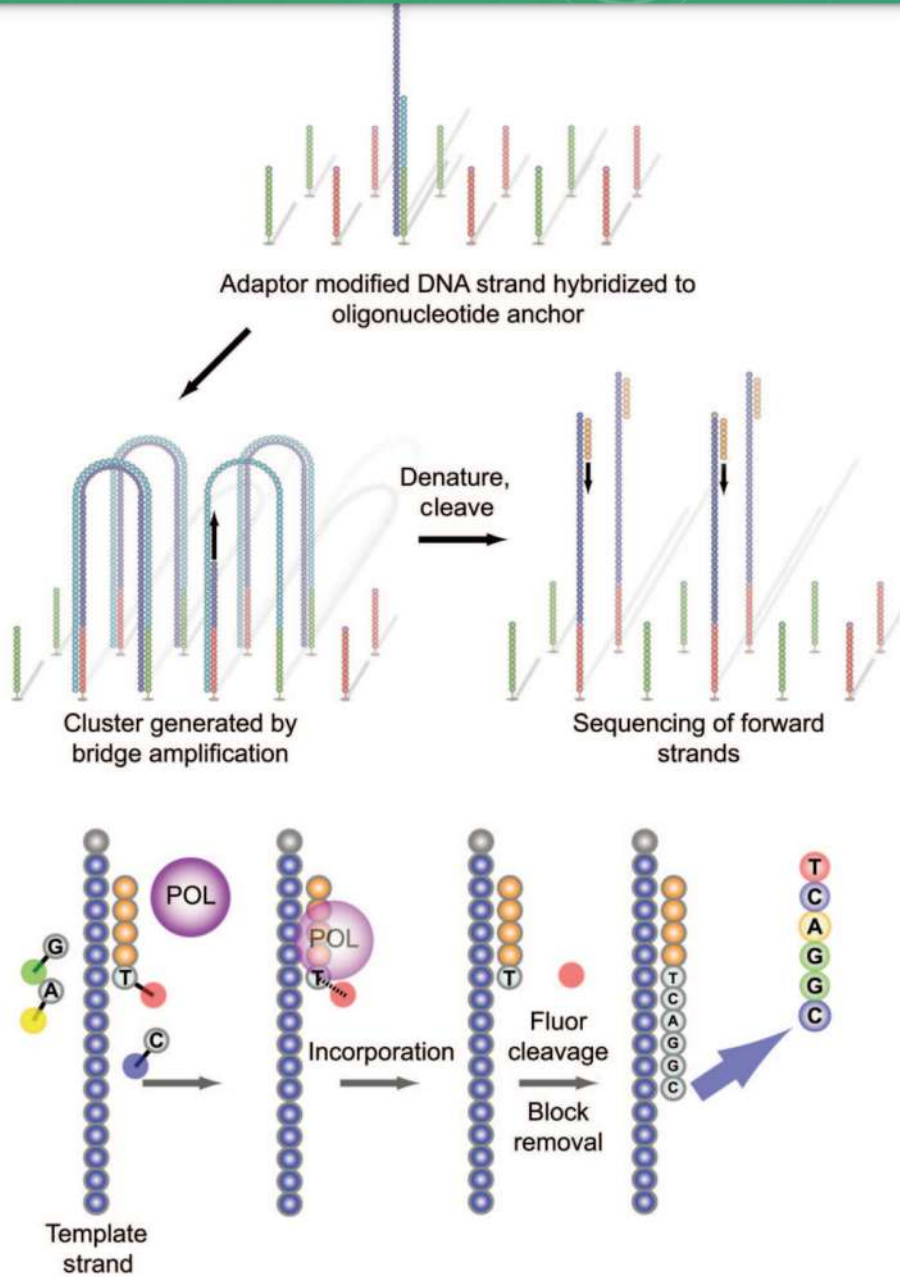


- Yarı iletken bir ip transistör ortam pH'ındaki değişimi (hidrojen iyonlarını) algılar.
- Tekrarlayan 9-10 bazda hatalar ortaya çıkar
- Floresan olmadığı için ucuz



ILLUMINA NGS SİSTEMLERİ





- Köprü PCR
- geri-dönüşümlü sonlanma (ddNTPler geri-dönüşümsüz)
- Adaptör eklenmiş DNA fragmanı flow celldeki oligonükleotide hibridize olur.
- Köprü amplifikasyonu klonal amplifiye DNA clusterları oluşturur.
- Clusterlar denatüre edilir ve serbst zincirler yıkılır.
- Sekanslama primer ve POL ve 4 çeşit geri-dönüşümlü boyalı terminatör eklenmesiyle başlar.
- Floresan kaydedilir.
- Flor ve blok ayrılır yeni baz siklusu başlar.

