



NGS в НИИ ФХБ – быть или не быть?

Мария Логачева, 15 февраля 2021

Области применения NGS

или

What can next generation sequencing do for you?

- секвенирование геномов и транскриптомов de novo

отправная точка большинства молекулярно-биологических и генетических исследований на немодельных объектах, поиск крупных геномных перестроек

- полногеномное ресеквенирование

поиск мутаций, ассоциированных с болезнями, картирование генов

- направленное ресеквенирование

биомедицина: скрининг мутаций с известной ролью в развитии болезней и поиск новых мутаций

- анализ транскриптома

сравнение уровней экспрессии, поиск новых генов и изоформ, аннотация de novo секвенированных геномов

- регуляция генома

ДНК-белковые и ДНК-ДНКовые взаимодействия: поиск сайтов связывания транскрипционных факторов, изучение пространственной организации хроматина, метилирование

- метагеномика

анализ разнообразия микробных сообществ

NGS в НИИ ФХБ



MiSeq
2012 год,
гранты
НИИ ФХБ



NextSeq500
2016 год,
предоставлен
Институтом
проблем
передачи
информации
РАН (договор
до 2022 года)

Сравнительные характеристики приборов

	Число прочтений	Длина чтения	Время работы	Мультиплексирование	Цена запуска
MiSeq	10-20 млн	300+300	8-65 часов	до 96 образцов	170 тыс.
NextSeq500	130 – 400 млн	150+150	11-29 часов	до 96 образцов	550 тыс.

Области применения

MiSeq

- секвенирование маленьких геномов (бактерии, вирусы) и ампликонов, метагеномика

Nextseq

- транскриптомика, секвенирование экзонов, среднего размера геномов

Особенности использования услуг сторонних организаций (аутсорсинг)

Работа осуществляется:

- по стандартным протоколам
- только с образцами хорошего качества и высокой концентрации

Данные:

- представляет собой последовательности без детального описания проведенных с образцами процедур,
- практически невозможно общение сотрудников, обрабатывающих данные с сотрудниками, выполнявшими их получение

В результате:

- возникновение ошибок в анализе данных из-за недоучета особенностей подготовки проб для секвенирования
- невозможность нахождения путей решения проблем, возникающих как при получении, так и при анализе данных.

Особенности использования услуг сторонних организаций (аутсорсинг)

Работа осуществляется:

- по 100% предоплате, а при работе с российскими фирмами-посредниками по схеме оплаты 30/70 стоимость секвенирования увеличивается больше, чем в 2 раза.
- с долгой процедурой сбора и отправки образцов,
- большим размером минимальной партии образцов,
- требуются расходы по статье «услуги сторонних организаций», которая существенно ограничена в смете большинства проектов.
- требуется точная оценка необходимого объема секвенирования, что невозможно для большой части запланированных исследований

В результате:

- Практически невозможно заказать секвенирование одного или небольшого числа образцов с низким покрытием, для проверки его качества перед проведением глубокого секвенирования или для оценки эффективности того или иного протокола подготовки проб.
- Время от отправки образцов до получения результатов составляет до полугода, в зависимости от сложности и объема необходимой работы.

Новые приборы Illumina



NovaSeq6000

- 2 независимых ячейки
- длина чтения до 250+250
- качество – 75-85% Q30
- число чтений – до 10 миллиардов
- время работы – от 13 до 38 часов

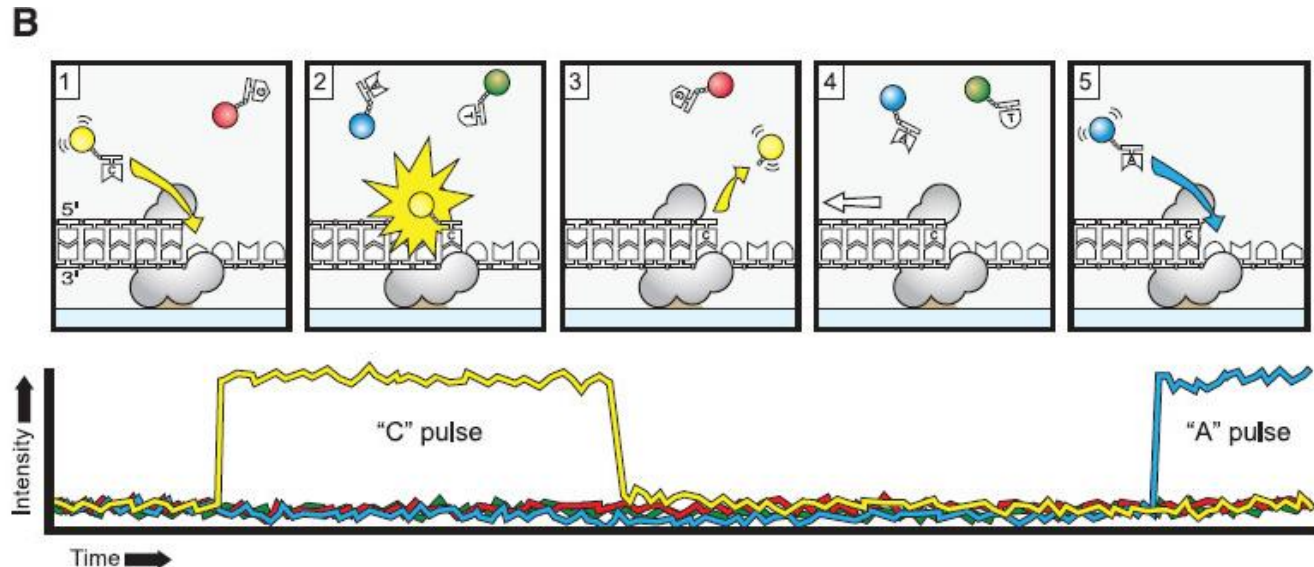
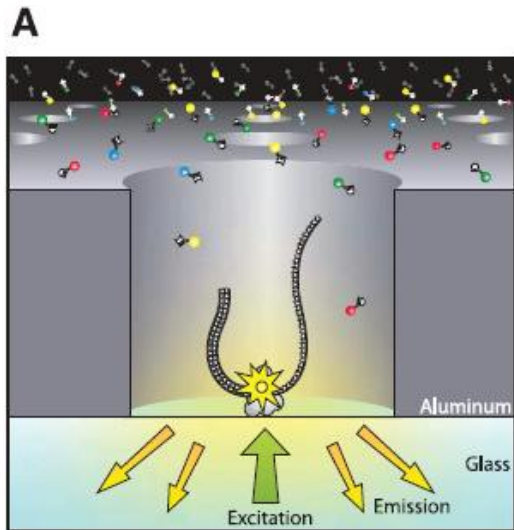


Nextseq1000/2000

- длина чтения до 150+150
- число чтений – до 500 миллионов (Nextseq1000), до 1 миллиарда (Nextseq2000)
- время работы – от 11 до 48 часов

3 поколение секвенирования: Pacific Bioscience

- Очень длинные чтения (10-50 Kb)
- Высокая частота ошибок (10-15%, но есть способы борьбы)
- Возможна детекция модификаций
- Можно секвенировать участки до 100% GC



Pacific Bioscience Sequel II

Поиск структурных
вариаций в геномах с
известным референсом

Де ново сборка больших
геномов, с высоким
количеством повторов и
гетерозиготностью

Прямая детекция
модификаций в РНК и ДНК



Секвенирование
GC-богатых
участков

Получение
полных
последовательн
остей изоформ,
анализ
альтернативного
сплайсинга

Метагено
мика

3 поколение секвенирования

Нанопоровое секвенирование (Oxford Nanopore technologies)

- Очень длинные чтения
- Прямая детекция модификаций
- Прямое секвенирование РНК
- MinION – небольшой и дешевый прибор
- Высокая доля ошибок (особенно инделей)
- Малая производительность
- Не применимо для «counting applications»

