

## 補充資料：Next Generation Sequencing (NGS)



**454 GS FLX\***



**AB SOLiD**



**Illumina GAIi**

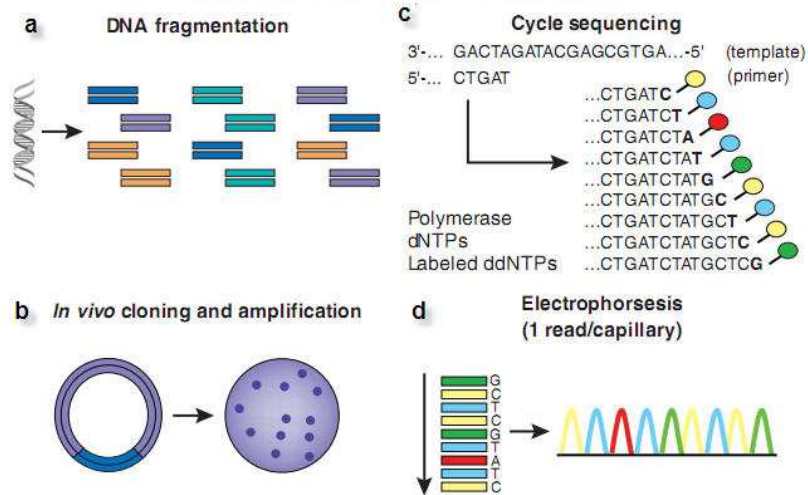
| Chemistry          | Pyrosequencing    | Ligation based      | Reversible terminators   |
|--------------------|-------------------|---------------------|--------------------------|
|                    | <b>Standard</b>   | <b>Fragment</b>     | <b>Fragment</b>          |
| Run Time           | 7 hours           | 3-6.5 days          | 3 days                   |
| Read Lengths (bp)  | 250               | 25, 50              | 35, 50                   |
| Ave. Reads per Run | 400K              | 150x10 <sup>6</sup> | 85x10 <sup>6</sup>       |
| Data per run       | 100MB             | up to 7GB           | up to 4.3GB              |
| Throughput         | 100MB             | 1.1GB/day           | 1.4GB/day                |
|                    | <b>Titanium</b>   | <b>Mate-Paired</b>  | <b>Mate-Paired</b>       |
| Run Time           | 10 hours          | 7-13 days           | 6.5 days                 |
| Read Lengths (bp)  | 400+              | 2x25, 2x35          | 2x50                     |
| Ave. Reads per Run | 1x10 <sup>6</sup> | 250x10 <sup>6</sup> | 90x10 <sup>6</sup> pairs |
| Data per run       | 400MB             | up to 8.75GB        | 9Gb                      |
| Throughput         | 400MB             | 900MB/day           | 1.3GB/day                |

\*Metrics apply to both Fragment and Mate-Paired runs.

Copyright © 2008 Pearson Education Inc., publishing as Pearson Benjamin Cummings

## 補充資料

Figure 1. Sanger Sequencing Method



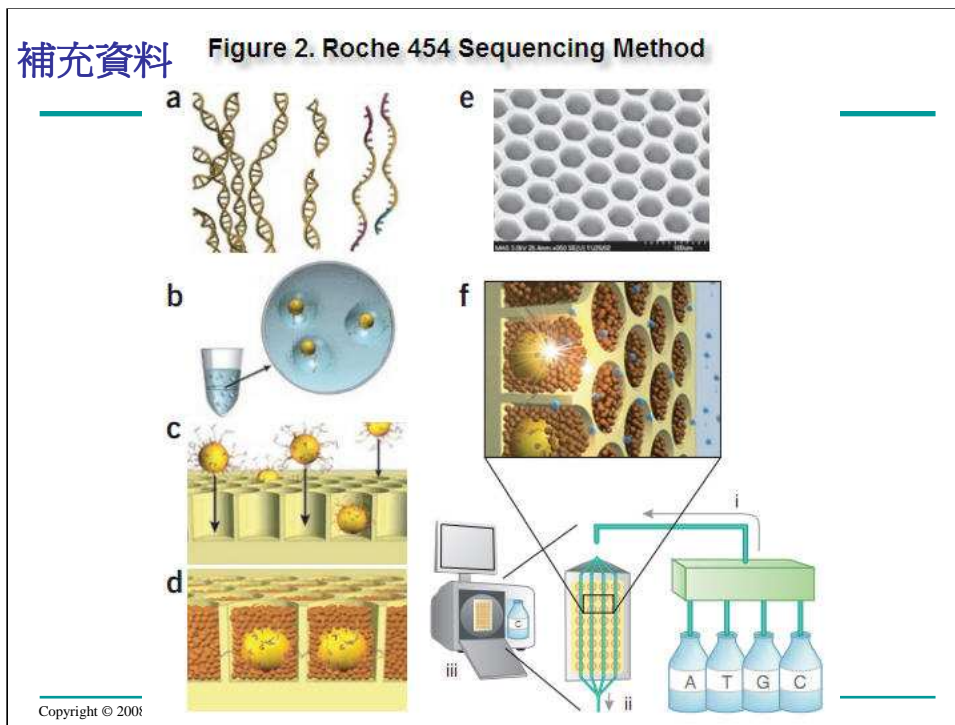
Copyright © 2008 Pearson Education Inc., publishing as Pearson Benjamin Cummings

a) 首先将待测基因组序列打断成较短的DNA片段，以方便后面的处理。  
b) 将所得的DNA片段连入质粒载体在*E.coli*体内扩增，使DNA片段得到富集。挑取单菌落分离纯化出其中的质粒用去测序。  
c) 在反应体系中加入DNA聚合酶，dNTP以及带有荧光标记的双脱氧核苷酸ddNTP。由于ddNTP的链终止作用，使得对于每个片段的DNA模板，会扩增出一系列长短不一且3'端带有荧光标记ddNTP的核苷酸片段。当扩增出来的这种片段足够多的时候对于模板的每一个核苷酸位点都有相应的荧光标记3'端ddNTP与之对应。  
d) 这样，我们通过毛细管凝胶电泳来分析这一系列标记过的核苷酸片段，收集每个位点上的荧光信号，通过软件处理，就可以得到高质量的DNA序列信息。我们前面说过，现在的Sanger测序仪采用96个毛细管电泳管的阵列，可以同时进行96个这样的测序反应，每个反应得到的Read长度可以达到1000bp以上。

<http://bestrok.blogspot.com/2009/01/next-generation-sequencing-technique.html>

補充資料

Figure 2. Roche 454 Sequencing Method

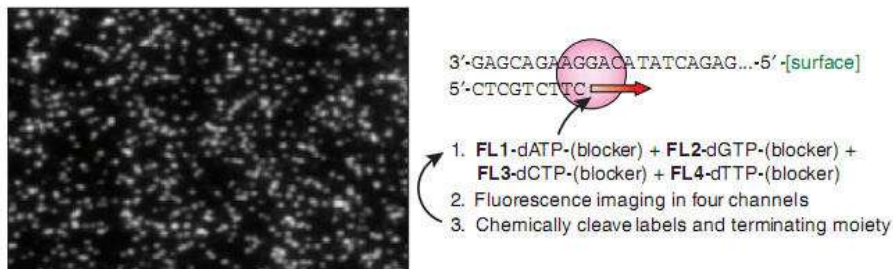


a) 将待测基因组序列打断成较短的DNA片段，片段两端分别连接特定接头，并使双链熔解拆分为单链DNA分子。b) 利用直径为 $28\mu\text{m}$ 的DNA吸附珠与单链DNA分子特定端接头的吸附作用吸附固定单链DNA分子（控制条件使每一个珠子仅吸附一条DNA单链分子），然后利用乳化PCR（emulsion-based PCR, emPCR）扩增每个珠子上的DNA分子拷贝数，以备下一步测序使用。c-e) 将每个珠子置于隔离反应井中（每个反应井 $55\mu\text{m}$ 深，直径 $44\mu\text{m}$ ）。f) Roche 454使用焦磷酸法测序，其反应原理是在DNA聚合酶、ATP硫酸化酶（ATP:sulfurylase 或 ATP:sulfate adenylyltransferase）、荧光素酶（luciferase）和三磷酸腺苷双磷酸酶（apyrase）4种酶的协同作用下，将每一个dNTP的聚合与一次荧光信号的释放偶联起来。f) 记录并分析这些荧光信号，就可以获得高质量的DNA序列。Roche 454法现在每次可以同时进行400,000个反应，每个反应得到的Read长度可以达到500bp左右。

<http://bestrok.blogspot.com/2009/01/next-generation-sequencing-technique.html>

## 補充資料

Figure 3. Solexa Sequencing Method



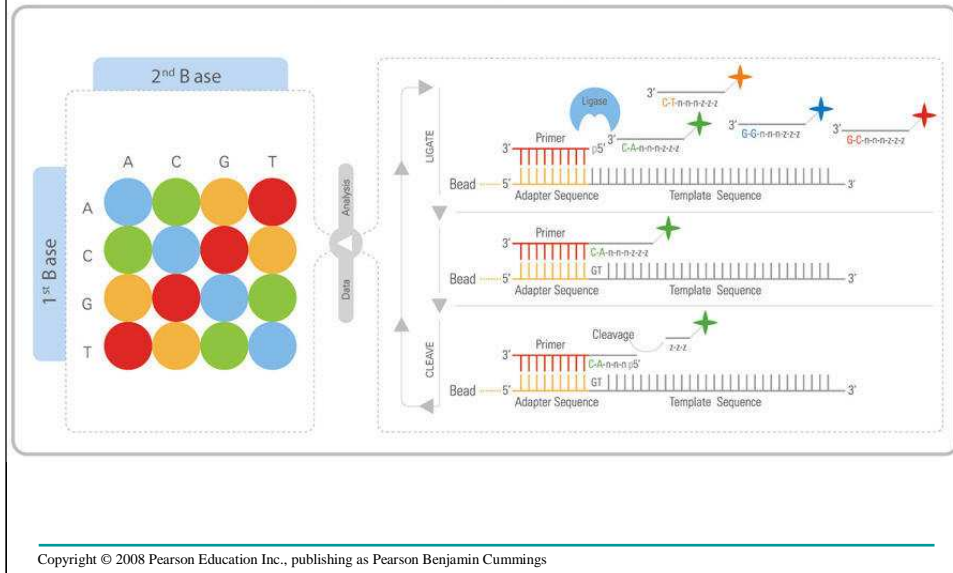
Copyright © 2008 Pearson Education Inc., publishing as Pearson Benjamin Cummings

， a) 将待测基因组序列打断成较短的DNA片段，片段两端分别连接特定接头，并使双链熔解拆分为单链DNA分子。b) 通过接头将单链DNA分子随机吸附在反应板表面，然后利用桥式 PCR（bridge PCR）扩增每个单链DNA分子拷贝数。通过这一步，同种单链DNA将成簇分布在反应板表面。c) 加入改造过的DNA聚合酶和带有4种荧光标记（分别针对dATP,dTDP,dGDP,dCDP)和可变粘性3'端的dNTP。对任何一条模板序列，它在聚合1bp的核苷酸后由于聚合上去的dNTP粘性末端被封闭，将无法再聚合第二个核苷酸。此时，用激光扫描反应板表面，读取每条模板序列第一轮反应所聚合上去的核苷酸种类。加入试剂去除被聚合上去的dNTP的荧光基团，然后恢复3'端粘性，继续聚合第二个核苷酸。如此继续下去，直到每条模板序列都完全被聚合为双链。这样，联合统计每轮收集到的荧光信号结果，就可以得知每个模板DNA片段的序列。这种方法一次可以同时完成3000~6000万个反应，但每个反应的Read长度暂时只能达到30bp左右。

<http://bestrok.blogspot.com/2009/01/next-generation-sequencing-technique.html>

## 補充資料

Figure 4. SOLiD Sequencing Method



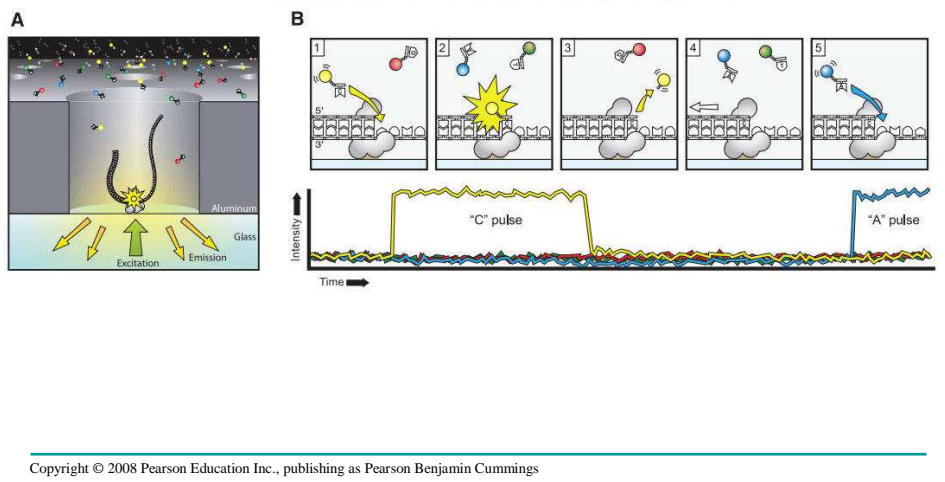
Copyright © 2008 Pearson Education Inc., publishing as Pearson Benjamin Cummings

a) 将待测基因组序列打断成较短的DNA片段，片段两端分别连接特定接头，并使双链熔解拆分为单链DNA分子。b) 利用直径为 $1\mu\text{m}$ 的DNA吸附珠与单链DNA分子特定端接头的吸附作用吸附固定单链DNA分子（控制条件使每一个珠子仅吸附一条DNA单链分子），然后利用乳化PCR（emulsion-based PCR, emPCR）扩增每个珠子上的DNA分子拷贝数，以备下一步测序使用。将珠子随机吸附在反应平板上。c) 采用一系列用荧光标记的寡核苷酸（8个核苷酸）探针，探针3'端的前2个核苷酸为测序反应提供信息。ABI SOLiD法与以上几种方法显著不同的是它使用DNA连接酶而非聚合酶进行测序反应。通过连接反应，不同的寡核苷酸探针与模板序列竞争结合，只有3'端前两个核苷酸与模板链相应位置完全配对互补的探针才会被连接到模板的互补链上，这样，通过多轮反应，模板链上位置编号为（1 or 2 + 8N）的核苷酸位点的序列将被测定。然后将模板互补链的引物接头延长一个核苷酸，同样的采用连接酶进行多轮测序，则模板链上位置编号为（2 or 3 + 8N）的核苷酸位点的序列将被测定，如此反复几次，就可以获得模板DNA分子的全长序列信息。由于采用了更小的吸附珠子，这种方法比Roche 454法拥有更高的通量，但每个反应的Read长度暂时只能达到35bp左右。

<http://bestrok.blogspot.com/2009/01/next-generation-sequencing-technique.html>

## Extra

Figure 5. Pacificbiosciences Real-time Sequencing Method



a) 将DNA聚合酶固定在直径为100nm的zero-mode waveguide (ZMW) 上, 通过对调节的控制, 可以实现每个waveguide顶端表面仅吸附一个DNA聚合酶。ZMW的纳米结构为DNA聚合反应提供良好的反应隔离条件。

b) 为对四种dNTP的磷酸基团做不同颜色的荧光标记, 然后让这些dNTP进行DNA聚合反应。这样, 每一个被聚合到模板链的互补链上的dNTP都会释放出代表着这个种碱基的荧光信号, 而且随着后一个dNTP的聚合反应, 前面已经结合上去的dNTP分子的荧光信号会被猝灭。c) 荧光信号通过ZMW被电脑终端所收集并进行详细分析, 从而获得模板DNA分子的真实序列。该方法与前面几个方法的差别主要体现在不需要对DNA样品做富集化处理, 这意味着前期准备工作会轻松很多。该方法是伴随着DNA分子聚合反应的实时测序法, 其可靠性有很好的保证。该研究组发表在 *Science* 2009年第一期上的文章表明他们的这种方法已经能将每个Read的长度扩展到1000bp, 即可以媲美传统的Sanger测序法, 而ZMW的nm级的规格将有助于大大提高测序通量以及实现测序仪小型化。另外, 该技术对待测DNA样本的要求很低, 不需要做前期扩增, 因此大大提升了整个测序过程的自动性, 拥有非常好的应用前景。虽然这项测序技术现在还没有被全基因组测序所检验, 但相信很快就会有这方面的报道, 并且很快实现产品商业化。

<http://bestrok.blogspot.com/2009/01/next-generation-sequencing-technique.html>