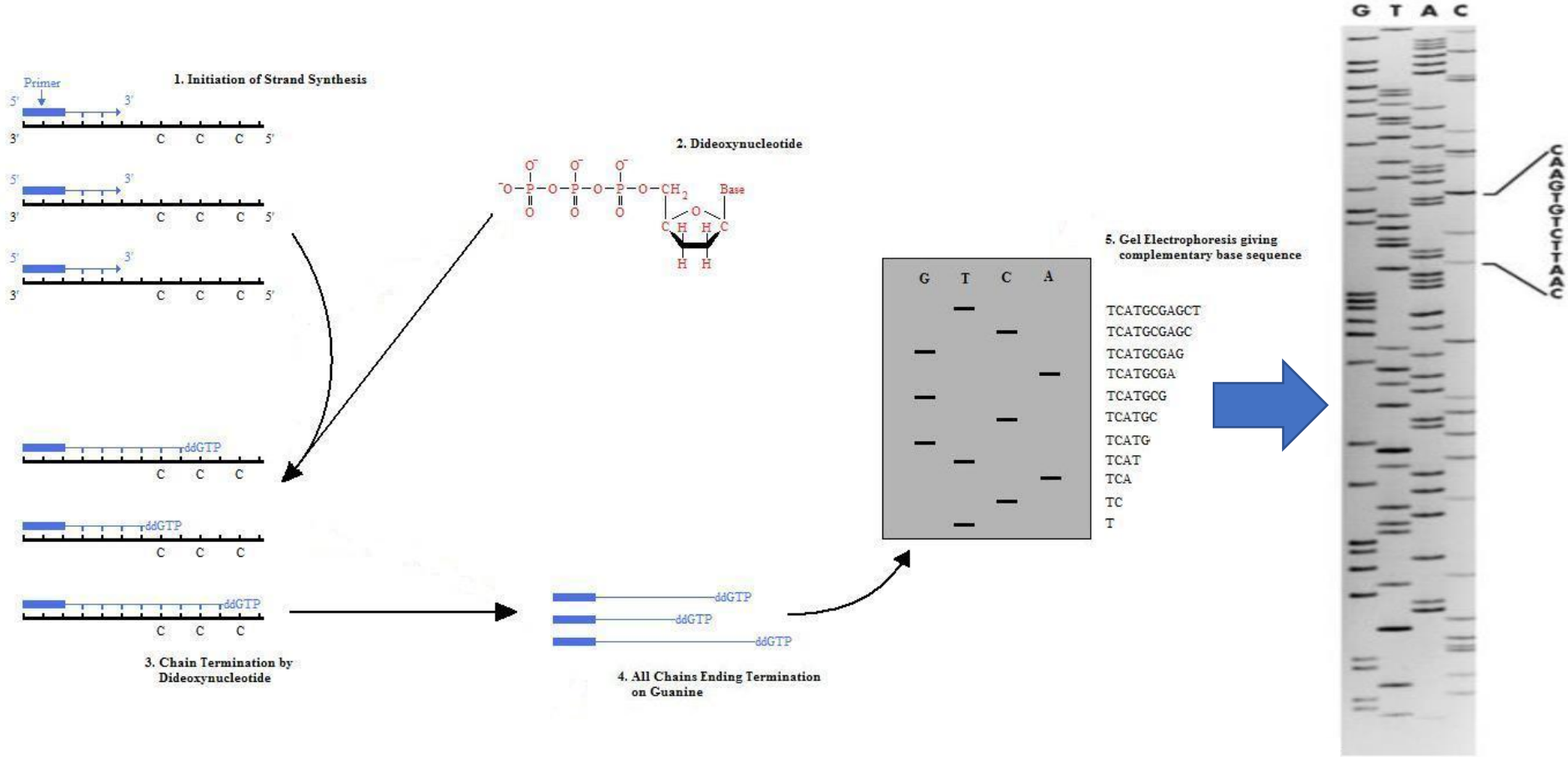
Sequenciamento de Nova Geração (NGS)

Luciana R Montenegro
lucianam@usp.br

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – Lim42

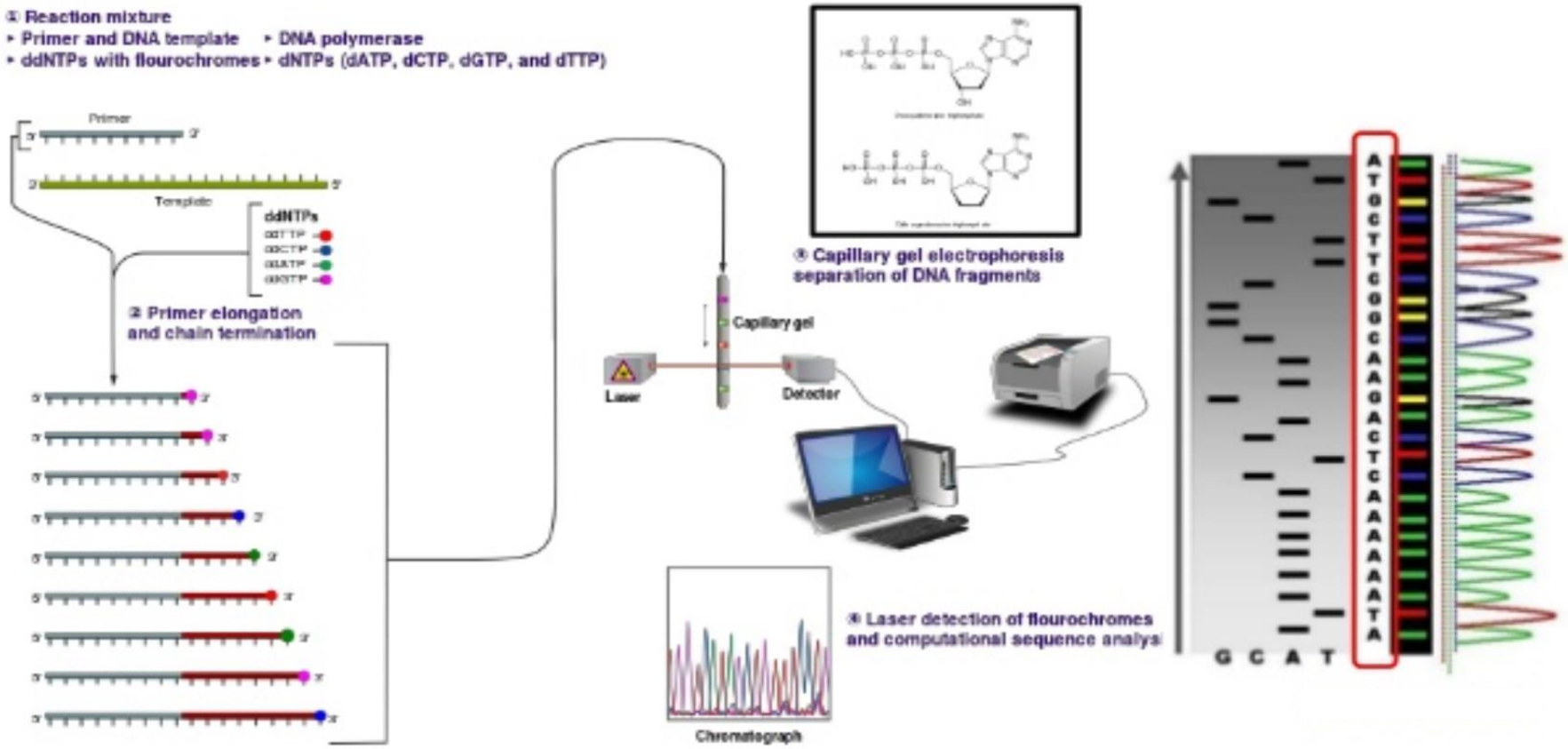
Evolução dos métodos de sequenciamento

1977 – Publicado o primeiro método popular de sequenciamento da DNA: sequenciamento por terminação em cadeia ou método de Sanger



Evolução dos métodos de sequenciamento

- 1986 foi lançado o primeiro sequenciador automático de DNA - ABI 370
- 1998 foi lançado o primeiro sequenciador de eletroforese capilar - ABI 3700.



Next generation Sequence (NGS)
Sequenciamento de nova geração

- A partir de 2005 surgiram as primeiras tecnologias de sequenciamento de DNA conhecidas como NGS

- Processos de sequenciamento de DNA que utilizam metodologias diferentes da de Sanger, com o objetivo de acelerar e baixar o custo do processo de sequenciamento.

- Se baseiam no processamento paralelo massivo de fragmentos de DNA.

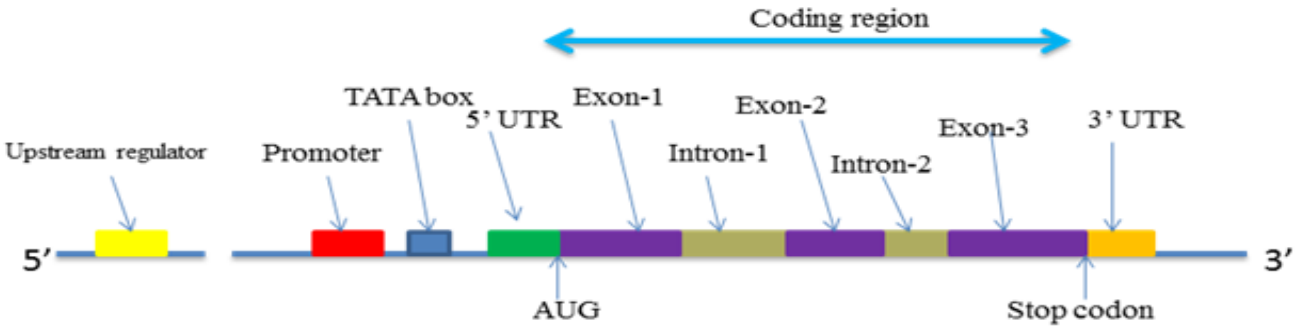
Aplicações

- Sequenciamento de novo
- Target sequencing
- Whole genome sequencing
- Genômica populacional
- Diagnósticos
- Genômica de câncer
- Metagenômica
- Sequenciamento RNA
- Genoma antigo
- Qualquer coisa com DNA...

Etapas comuns entre todos os sequenciadores :

- preparo da amostra
- amplificação da biblioteca
- sequenciamento

Target Sequencing
Sequenciamento de regiões alvo específicas



- **Exoma:** Regiões alvos codificadoras conhecidas. Sequencia referência dos bancos de dados RefSeq, GENCODE, CCDS e UCSC (variantes patogênicas de genes incluídos nas diretrizes da ACMG).

- **Painel:** analisa toda a região codificadora e/ou região intrônica e/ou região intergênica e/ou regiões 5'e 3'UTR.

Preparo das amostras

Sequenciamento

Exoma x Painel - NGS

Exoma:

- All Exon V6: 60Mb

Painel:

- Tier 1: 1-500 kb
- Tier 2: 0.5-2.5 Mb
- Tier 3 : 2.6 Mb-5 Mb

Painel de genes

- Painel de pesquisa de genes associados ao DDS por participarem das vias de determinação testicular ou diferenciação sexual -

1º Painel Tier 1 – 63 genes

AMH	DMRT1	HNF1B	NR0B1	SOX 9	NANOS 3	RAC1
BMP15	DMRT2	LHX9	PAPPA	SRY	AXIN1	GDF9
CITED2	FGF9	MAMLD1	PBX1	STAG3	GSK3B	TES
CBX2	FGFR2	MAP3K1	PTDGS	WNT4	WWOX	LHX1
DHH	FOXL2	NANOS2	RSPO1	WXT1	TCF21	
DHX37	GATA4	NR5A1	RSPO2	PAX2	ZFPM2	
AKR1C2	AKR1C3	AKR1C4	CYP17A1	CYP19A1	HSD11B1	HSD17B3
HSD3B2	POR	SRD5A2	STAR	CYP21A2		
AMHR2	ESR1	ESR2	FSHR	LHCGR		
ARX	ATRX	DHCR7	HNF1B	CDH7	AR	

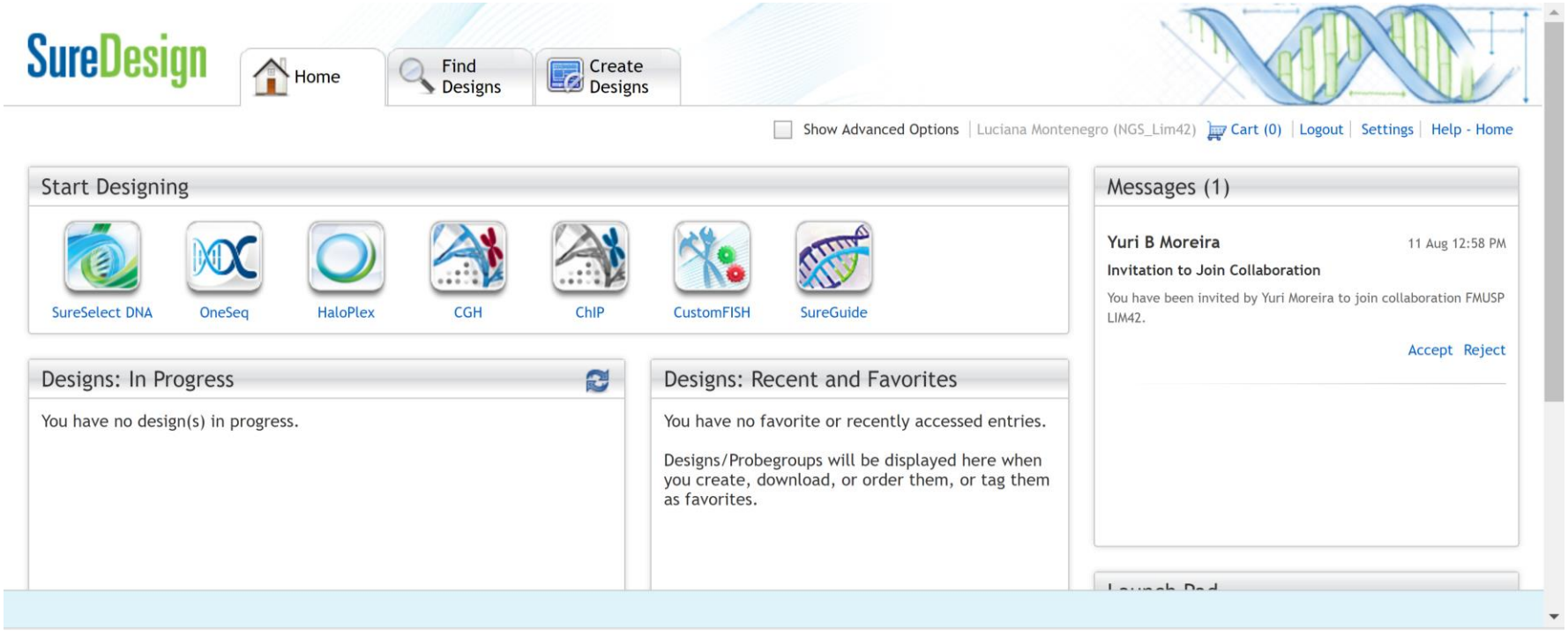
Regiões exonicas de genes relacionados à clínica de DDS (incluindo uma área de até 50bp antes e após cada exon e 5´e 3´UTR)

- Painel diagnóstico de genes associados a diversas clínicas da endocrinologia: Lípedes, Obesidade, Crescimento, Puberdade Precoce, Hipogonadismo Hipogonadotrófico, adrenal, distúrbio de diferenciação sexual, hipopuituitarismo...

2º Painel Tier 2 – 773 genes

Regiões exonicas de genes – incluído apenas 10pb ao redor de cada exon e excluído regiões 5´e 3´UTR

Desenho das sondas – Sure Design

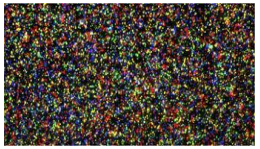


Fluxo de trabalho - NGS

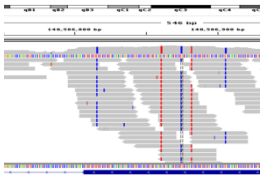
1- Preparo das bibliotecas

2- Geração de Cluster

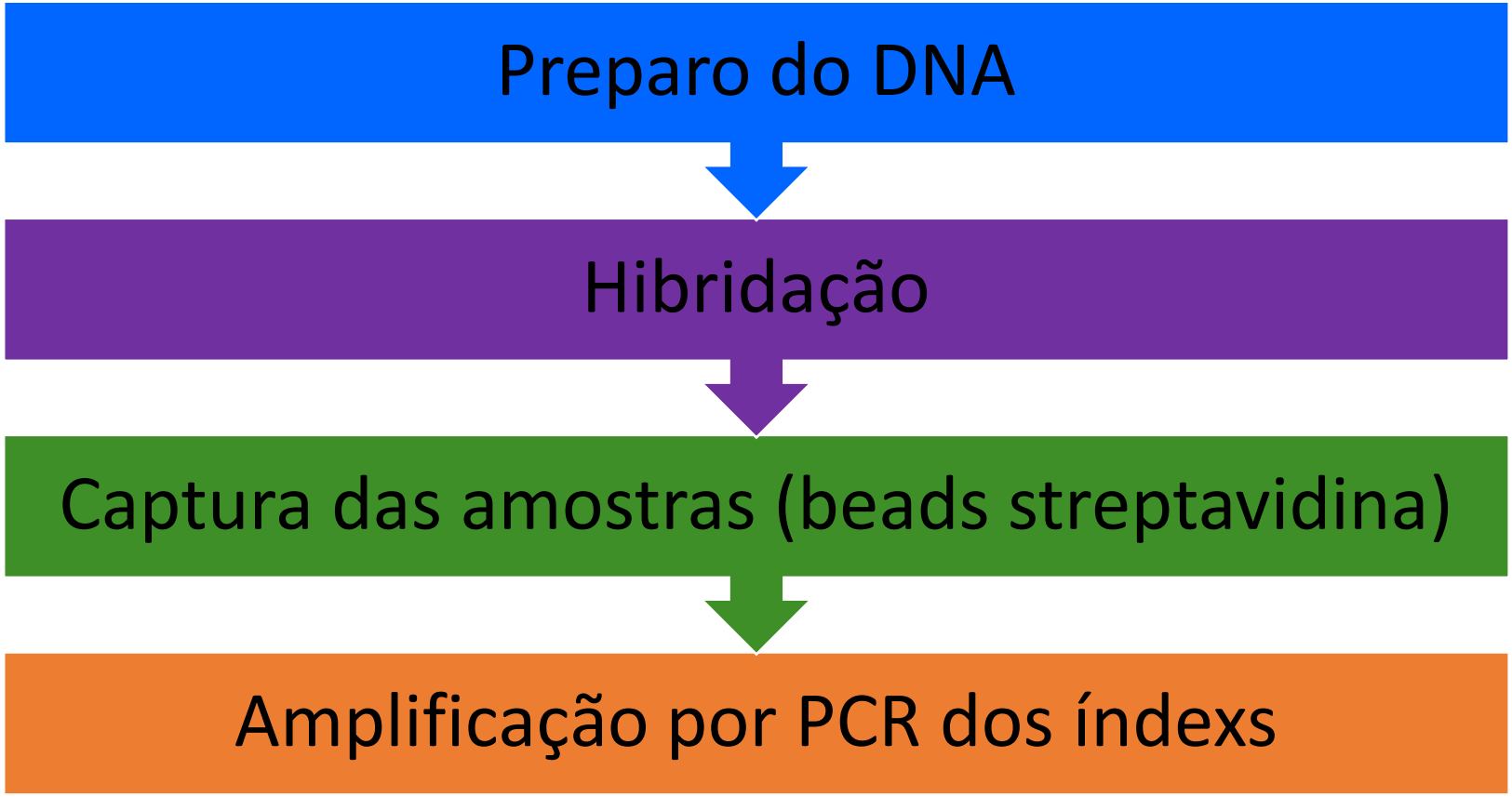
3- Sequenciamento



4- Análise dos dados



1- Preparo das bibliotecas

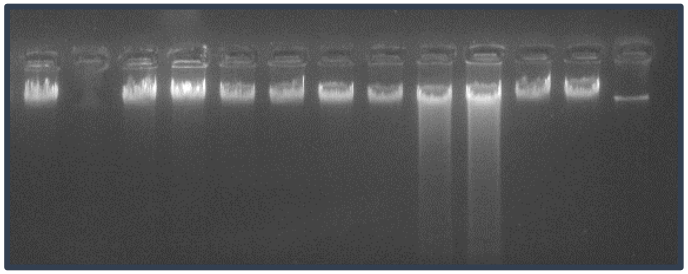


Preparo do DNA – 1º semana

- Análise de qualidade das amostras:

1ºdia:

- Gel de agarose 1% para verificar integridade do DNA



- Dosgem Nanodrop para verificar qualidade das amostras (A260/A280 entre 1.8 e 2.0)

2ºdia:

- Quantificação das amostras por Qubit dsDNA BR Assay para determinar a concentração

Preparo do DNA – 2º semana

1ºdia:

- Diluição das amostras de DNA de boa qualidade para 3µg ou 200 ng.
- Fragmentação mecânica - Covaris

DNA genômico

80 seg por amostra

DNA Fragmentado (300pb)

Obs: Dependendo do protocolo (3µg DNA) purificação usando AMPure XP beads após fragmentação no Covaris

Preparo do DNA – 2º semana

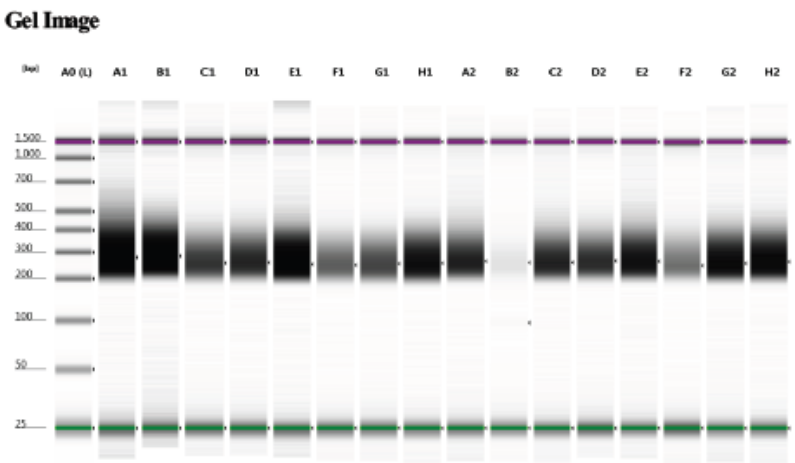
Preparo do DNA – 2º semana

- 2ºdia:

- Amplificação das bibliotecas pelos adaptadores

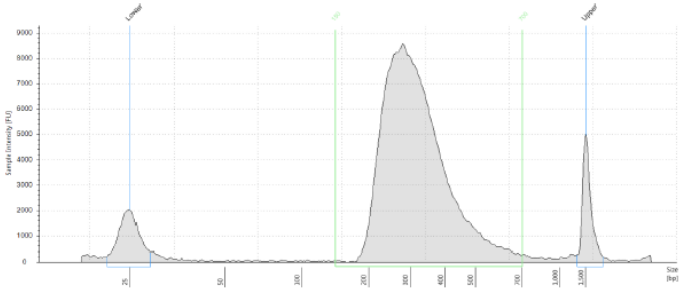
- Purificação do DNA amplificado usando AMpureXP beads

Análise de qualidade e quantificação das amostras – TapeStation (D1000 ScreenTape)



Peak Table

Size [bp]	Calibrated Conc. [ng/µl]	Assigned Conc. [ng/µl]	Peak Molarity [nmol/l]	% Integrated Area	Peak Comment	Observations
25	6.18	-	380	-		Lower Marker
281	66.5	-	364	100.00		
1,500	6.50	6.50	6.67	-		Upper Marker



Region Table

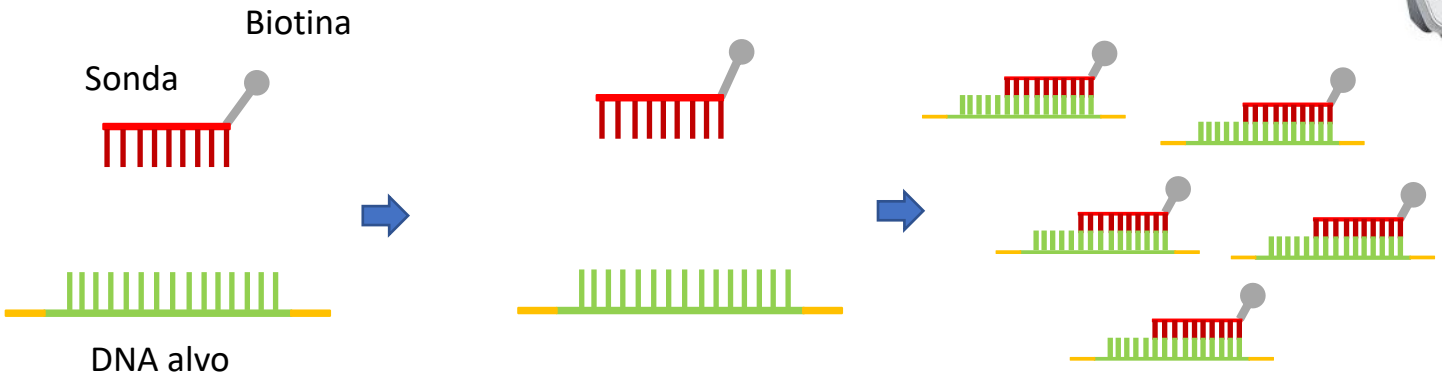
From [bp]	To [bp]	Average Size [bp]	Conc. [ng/µl]	Region Molarity [nmol/l]	% of Total	Region Comment	Color
150	700	325	77.8	395	95.58		

Hibridação – 2º semana

- **3ºdia:**

Secagem da placa ou amostra e resuspensão em água para concentração de 750ng – mínimo 3,4µL

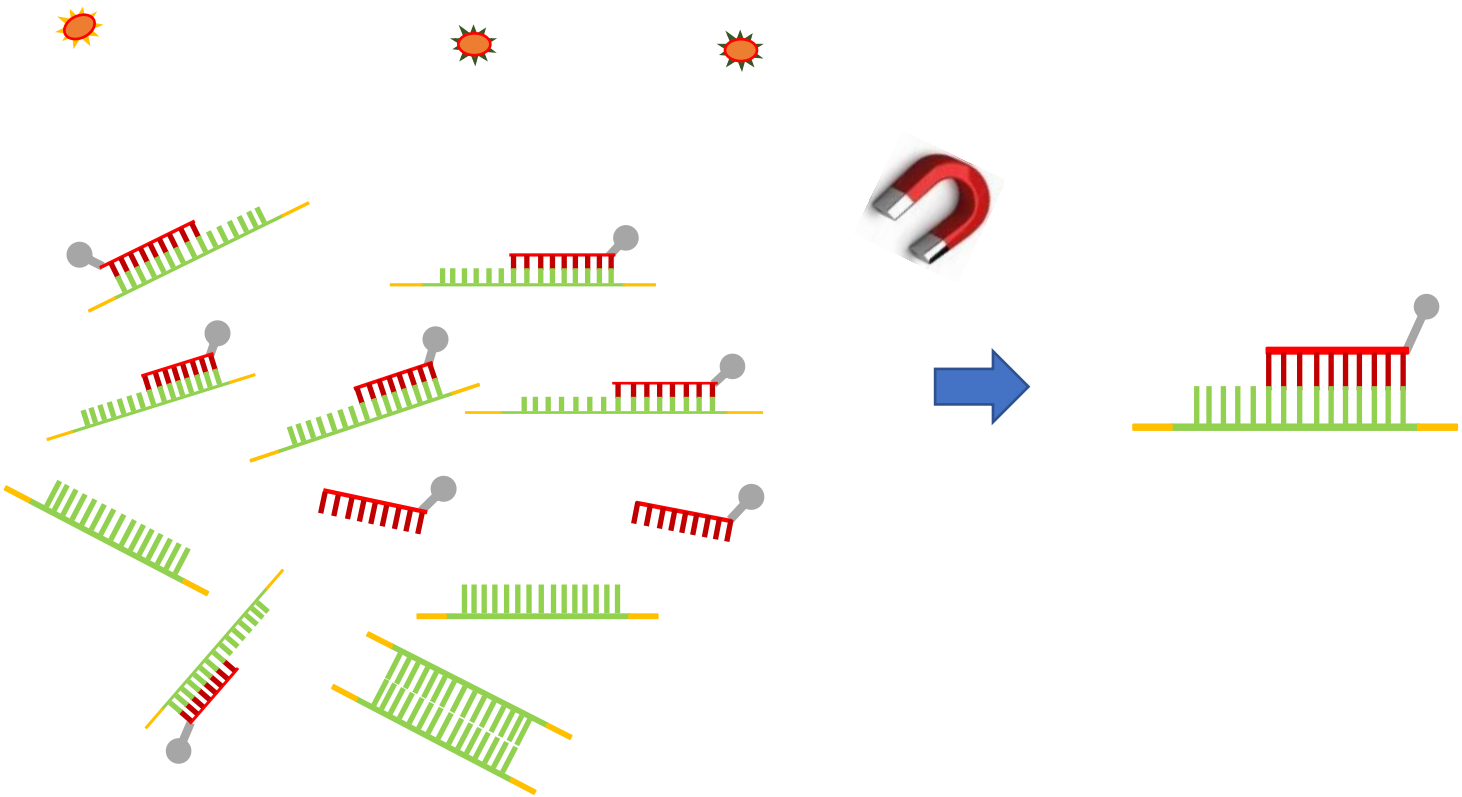
Hibridação das amostras com sondas específicas (painel/exoma) para posterior captura – “over night”



Captura das amostras – 2º semana

- 4ºdia:

Captura das amostras (beads streptavidina)



Amplificação por PCR dos índexs

Indexing:

A01	CTGAGCCA
B01	AGCCATGC
C01	GTACGCAA

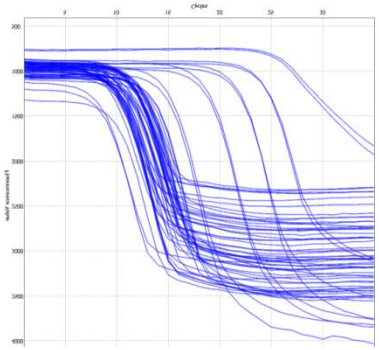
- Amplificação das bibliotecas capturadas para adição dos índex

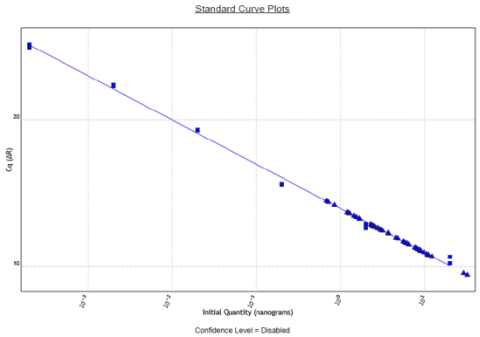
-Purificação das bibliotecas amplificadas por AMPure XP beads

- Analysis using an Agilent TapeStation and High Sensitivity D1000 ScreenTape

- **5ºdia:**

- qPCR para quantificação das bilbiotecas





2- Geração de cluster

- Preparo do pool de amostras (diferentes índex)

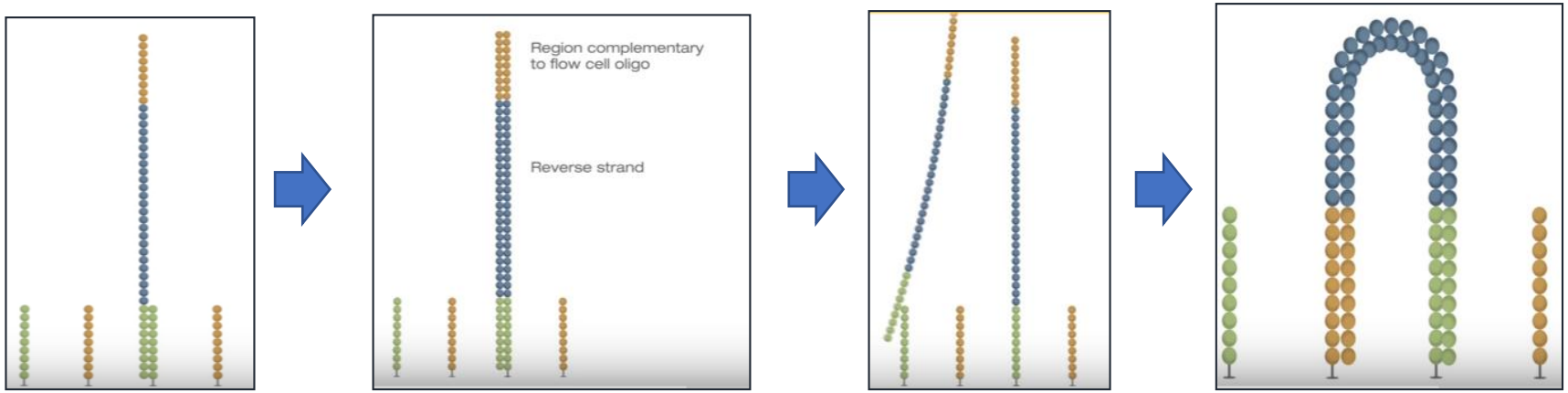
Flowcell – Rapid run - Hiseq

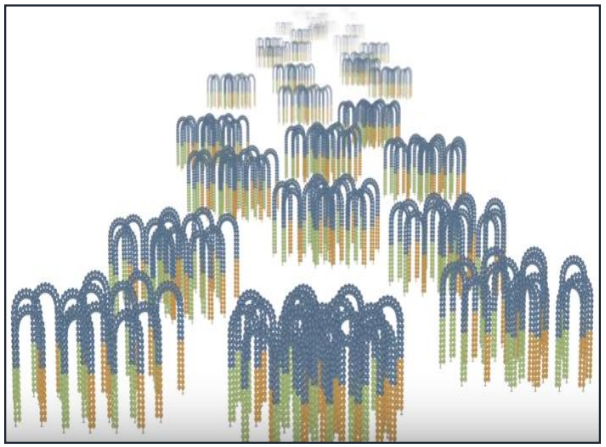
Flowcell – V4 - Hiseq

Adaptadores na flow cell

2- Geração de cluster

- Clusterização: cada molécula é amplificada isotermicamente para ser sequenciada

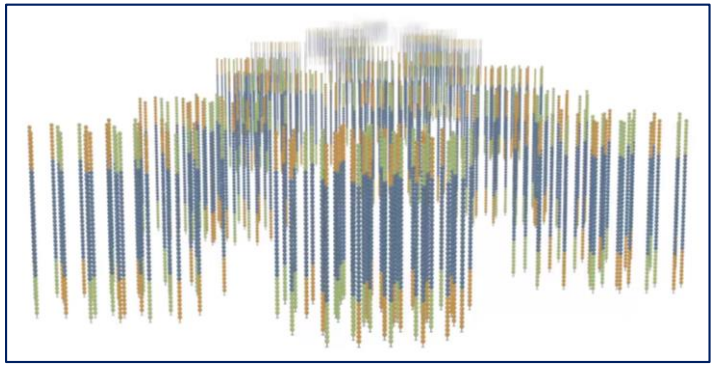


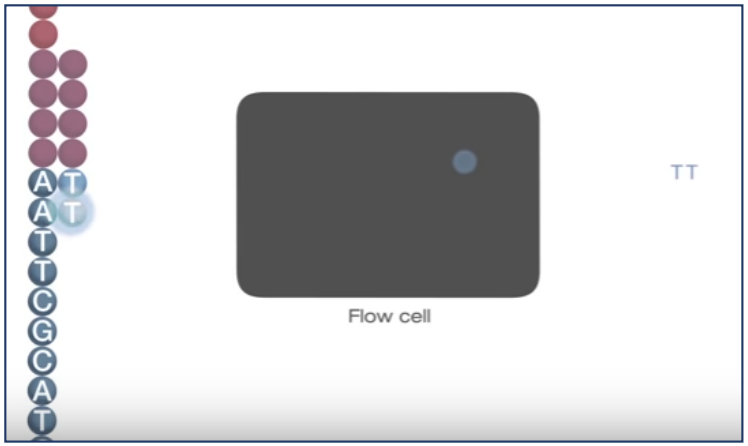


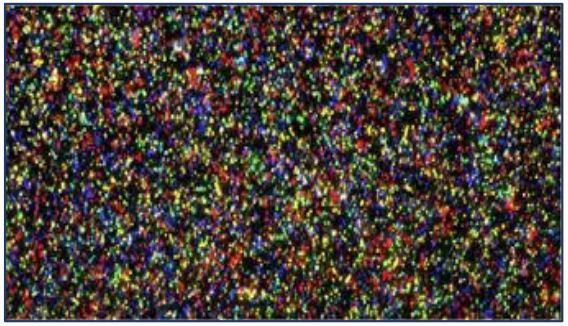
3- Sequenciamento

- Chamado de sequenciamento por síntese

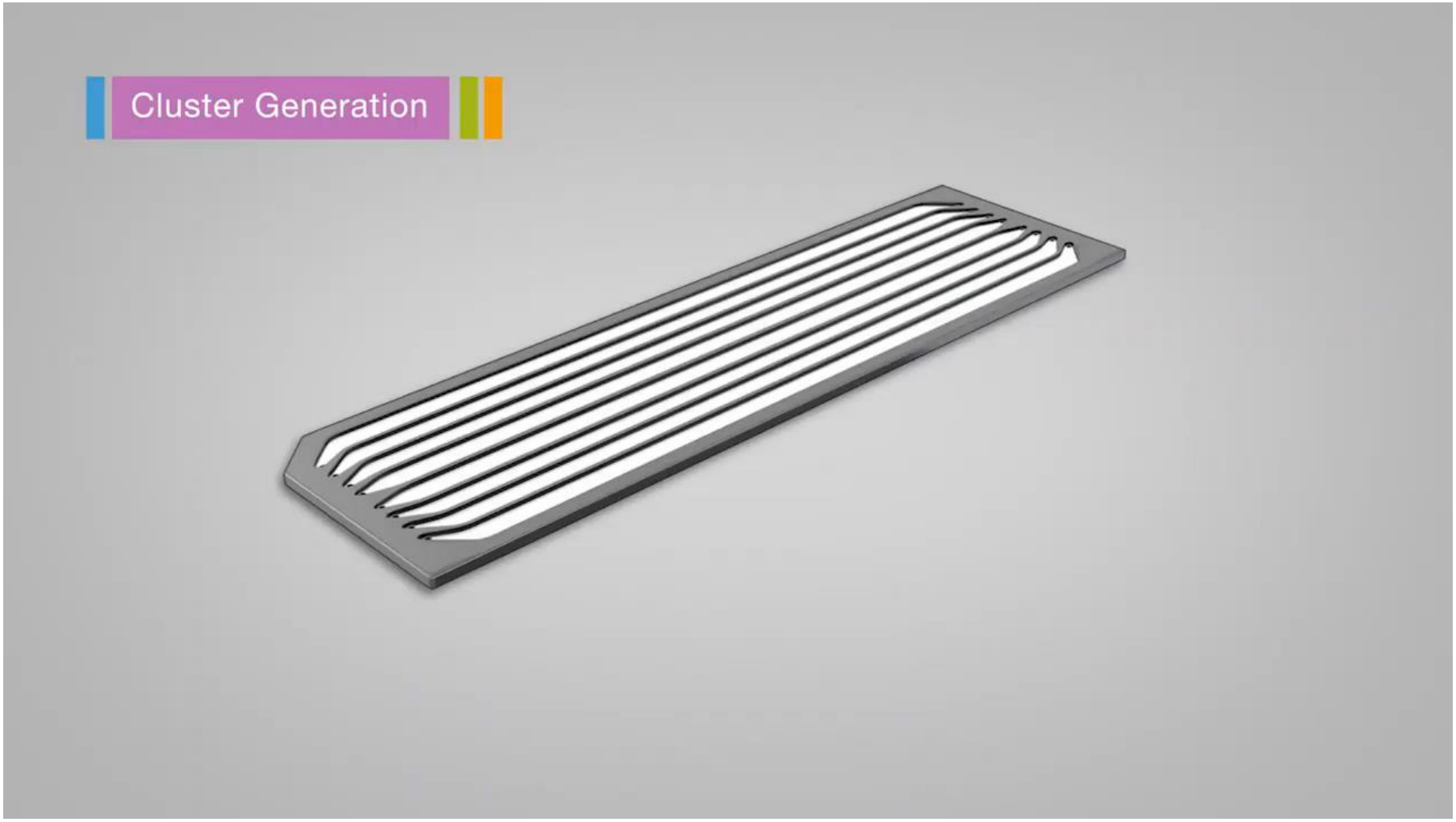
- Ao ocorrer a incorporação de um nucleotídeo, a fluorescência é excitada por uma série de lasers e captada por câmeras.







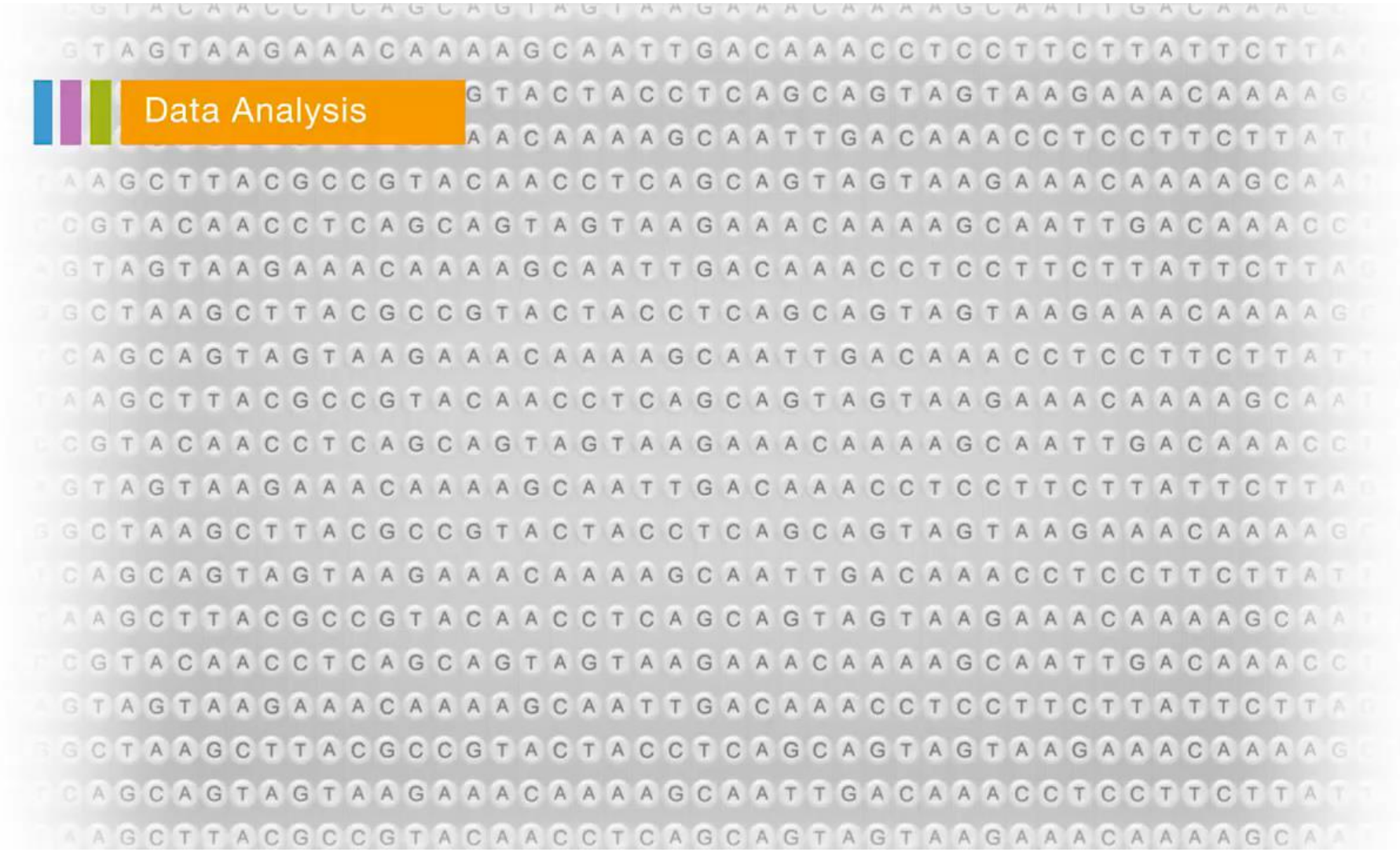
Geração de cluster e Sequenciamento



Aparelhos Ilumina

	MiSeq	NextSeq 500	HiSeq 2500
Output Range	0.3–15 Gb	20–120 Gb	10–1000 Gb
Run Time	5–55 hr	11–29 hr	7 hr–6 days
Reads per Run	1–25 million	130–400 million	300 million–4 billion
Max Read Length	2 × 300 bp	2 × 150 bp	2 × 250 bp (Rapid run) 2 × 125 bp (High output)
Samples per Run	1–384	96	1–8

4- Análise dos dados - Bioinformática



OBRIGADA!!

SELA
Laboratório
de Sequenciamento
em Larga Escala
da FMUSP