

УДК 577.21+616

ББК 28.04

Р31

А в т о р ы:

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

**Ребриков Д. В.**

Р31 NGS: высокопроизводительное секвенирование /  
Д. В. Ребриков, Д. О. Коростин, Е. С. Шубина,  
В. В. Ильинский ; под общ. ред. Д. В. Ребрикова. —  
6-е изд., электрон. — М. : Лаборатория зна-  
ний, 2024. — 235 с. — Систем. требования: Adobe  
Reader XI ; экран 10". — Загл. с титул. экрана. —  
Текст : электронный.

ISBN 978-5-93208-671-1

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 прокариотических и эукариотических геномов и транскриптомов, метагеномного секвенирования, а также использованию 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

**Деривативное издание на основе печатного аналога:** NGS: высокопроизводительное секвенирование / Д. В. Ребриков, Д. О. Коростин, Е. С. Шубина, В. В. Ильинский ; под общ. ред. Д. В. Ребрикова. — 5-е изд. — М. : Лаборатория знаний, 2023. — 232 с. : ил. — ISBN 978-5-93208-345-1.

**В соответствии со ст.1299 и 1301 ГК РФ при устранении ограничений, установленных техническими средствами защиты авторских прав, правообладатель вправе требовать от нарушителя возмещения убытков или выплаты компенсации**

ISBN 978-5-93208-671-1

© Лаборатория знаний, 2015

# ОГЛАВЛЕНИЕ

А

Предисловие Е. Д. Свердлова.....	7
Предисловие М. С. Гельфанда.....	8
Предисловие авторов.....	9
Перечень компаний, упомянутых в тексте.....	11
Список сокращений.....	12
<b>Глава 1. Обзор методов определения последовательности нуклеиновых кислот.....</b>	<b>13</b>
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
<b>Глава 2. Технологии создания библиотек фрагментов ДНК для NGS .....</b>	<b>43</b>
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

А

<b>Глава 3. Коммерческие технологии высокопроизводительного секвенирования</b> .....	<b>66</b>
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
<b>Глава 4. Общие принципы обработки данных NGS</b> .....	<b>85</b>
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
<b>Глава 5. Оборудование и программные решения для обработки данных NGS</b> .....	<b>112</b>
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
<b>Глава 6. Планирование эксперимента с использованием NGS .....</b>	<b>122</b>
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
<b>Глава 7. Секвенирование индивидуальных геномов и транскриптомов прокариот .....</b>	<b>128</b>
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
<b>Глава 8. Исследование микробных сообществ методами NGS .....</b>	<b>146</b>
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

<b>ГЛАВА 9. Секвенирование геномов эукариот</b> .....	<b>162</b>
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
<b>ГЛАВА 10. Секвенирование транскриптомов эукариот</b> .....	<b>176</b>
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
<b>ГЛАВА 11. Повышение концентрации определенных последовательностей в библиотеке для NGS (таргетное секвенирование)</b> .....	<b>191</b>
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
<b>ГЛАВА 12. Применение высокопроизводительного секвенирования в медицинской практике</b> .....	<b>207</b>
12.1. Генетическое тестирование с использованием NGS....	207
12.2. Исследование патогенов и микробиома человека .....	220
Список литературы .....	222
<b>ГЛАВА 13. Перспективы высокопроизводительного секвенирования</b> .....	<b>223</b>
Список литературы .....	227
<b>Предметный указатель</b> .....	<b>228</b>