

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Monika Bláhová

Analýza genové exprese metodami sekvenace nové generace

Analysis of gene expression via next generation sequencing techniques

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce:

RNDr. Ing. Vladimír Krylov, Ph. D.

Praha, 2014

Chtěla bych poděkovat svému školiteli RNDr. Ing. Vladimíru Krylovi, Ph. D. za vedení při zpracování této bakalářské práce, za jeho rady a odbornou pomoc, které mi umožnily ji zdárně dokončit.

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 15. 5. 2014

Podpis

Monika Bláhová

Obsah

Abstrakt	5
Abstract.....	5
Klíčová slova	5
Keywords.....	5
Seznam zkratek.....	6
Úvod	7
Historie	8
RNA-seq metody	10
1. ROCHE/454 Sequencing	12
1. 1. Popis metody	12
1. 2. Výhody a nevýhody.....	13
2. Illumina.....	14
2. 1. Popis metody	14
2. 2. Výhody a nevýhody.....	16
3. SOLiD System.....	17
3. 1. Popis metody	17
3. 2. Výhody a nevýhody.....	20
4. Ion Torrent.....	21
4. 1. Popis metody	21
4. 2. Výhody a nevýhody.....	23
5. Pacific Biosciences	24
5. 1. Popis metody	24
5. 2. Výhody a nevýhody.....	25
6. Oxford Nanopore.....	26
6. 1. Popis metody	26
6. 2. Výhody a nevýhody.....	28

Metody umožňující analýzu genové exprese pouze z jedné buňky.....	29
STRT-seq.....	29
SMART-seq.....	29
CEL-seq.....	29
Quartz-seq.....	30
Závěr.....	31
Literatura	32
Elektronické zdroje.....	35

Abstrakt

Cílem práce je vytvořit přehled dnes dostupných metod analýzy genové exprese, uvést výhody a nevýhody daných metod a porovnat je. Sekvenování je dnes jedna z nejpoužívanějších molekulárních metod. Sekvenovací metody se dají rozdělit na tři skupiny, sekvenování první generace, druhé generace a třetí generace. Nejvíce využívanými jsou metody sekvenování druhé generace. Avšak velký potenciál má i třetí generace, u které se ztrácí důležitost amplifikace vzorku pomocí PCR.

Díky klesajícím nákladům a stoupající efektivitě se ale rapidně zvyšuje i množství dat. Rostou tak nároky na datová úložiště, výkon počítačů a důmyslnost softwarů, které velmi usnadňují zpracování získaných informací.

Abstract

The main task of this work is create review today's available methods for gene expression analysis, introduce advantages and disadvantages of this methods and compare them. Nowadays sequencing is one of the most usable molecular methods. Sequencing methods are divided to three groups, a first generation sequencing, a second generation sequencing and a third generation sequencing. The most useful are the second generation sequencing. However, the third generation sequencing have a big potencial too. It is not necessary amplificate samples using PCR thanks them.

Amount of data raises rapidly, thanks decreasing costs and increasing efficiency. Demands on data storage, computers output are growing. And softwares for data analysis are much clever than ever before.

Klíčová slova

genová exprese, sekvenování, Illumina

Keywords

gene expression, sequencing, Illumina

Seznam zkratek

dNTP	deoxynukleotidtrifosfát
A, G, C, T	adenin, guanin, cytosin, tymidin
ddNTP	dideoxynukleotidtrifosfát
PCR	polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction)
cDNA	komplementární DNA (complementary DNA)
sscDNA	jednořetězcová komplementární DNA (single-stranded complementary DNA)
dscDNA	dvouřetězcová komplementární DNA (double-stranded complementary DNA)
APS	adenosin-5-fosfosulfát
ATP	adenosintrifosfát
SMRT	Single Molecule Real Time sequencing (sekvenování molekuly v reálném čase)
ZMW	Zero-Mode waveguide (jamky snímající excitaci nukleotidu při syntéze komplementárního řetězce k templátu v metodě Pacific Biosciences)
NK	nukleová kyselina

Úvod

Od počátku sekvenování do současnosti bylo objeveno mnoho metod. Sangerova metoda sekvenování pomocí terminálních nukleotidů se označuje jako metoda sekvenování první generace, další techniky už spadají do sekce sekvenačních metod nové generace. Ty se dále dělí na druhou generaci, sem patří Roche 454, Illumina a SOLiD metody, a třetí generaci, kam se řadí techniky Ion Torrent, Pacific Biosciences s možností sekvenování jedné buňky v reálném čase (tzv. SMRT, Single Molecule Real Time sequencing) a Oxford Nanopore, což je revoluční novinka z roku 2012. Do třetí generace také spadá metoda Helicos, ale té se nebude tato práce věnovat, protože velice málo používaná, díky vysokým nákladům, avšak její přesnost dosahuje téměř sta procent.

V poslední době došlo také k enormnímu rozmachu tzv. masivních paralelních sekvenačních technik, které jsou založeny na enormním zmnožení DNA, rozdělení do fragmentů a jejich osekvenováním, to vše ve velmi malých objemech. Díky tomu jsou tyto metody levnější, rychlejší a přesnější. Umíme už osekvenovat nejen genom, ale i transkriptom, proteom, epigenom, dokonce jsme schopni nalézt i metylovaná místa v genomu buňky. Tato práce je však zaměřena na sekvenování transkriptomu. Přiblíží dnes nejčastěji používané metody, jejich výhody a nevýhody a stručně poukáže na možnost analýzy genové exprese získáním genomu pouze z jedné buňky.

Historie

Počátek sekvenování sahá už do 60. let minulého století, kdy M. Beer se svými spolupracovníky zjistili, že jednotlivé báze v DNA se dají označit sloučeninami uranu, díky kterým jsou poté dobře viditelné v elektronovém mikroskopu (Zobel & Beer, 1961). Tato metoda však měla značné nevýhody. Jednou z nich bylo nekompletní značení, časté výpadky způsobovaly posun čtecího rámce.

Několik let na to byla objevena nová metoda, které se říkalo plus a minus. Respektive to byly dvě metody a jejich objeviteli byli F. Sanger a A. R. Coulson (Sanger & Coulson, 1975). Obě metody byly založené na syntéze DNA řetězce. Podstatou plus metody bylo postupné degradování DNA řetězce T4 DNA polymerázou v přítomnosti jednoho z deoxyribonukleotidtrifosfátu (dNTP). Polymerázy v buňce mívají většinou více aktivit, nejznámější je syntéza nového řetězce podle templátu. Tyto enzymy mohou řetězec i degradovat, tomu se říká exonukleázová aktivita ve směru $5' \rightarrow 3'$. Pokud nejsou v jejím okolí nukleotidy, které by mohla doplňovat do nového řetězce nebo má před sebou několik nukleotidů dlouhý fragment hybridizovaný s templátem (například primery navázané na DNA), polymeráza se přepne a začne postupně nukleotidy odštěpovat. Další je aktivita opravná, opět se nazývá exonukleázová, ale tentokrát je ve směru $3' \rightarrow 5'$. Při syntéze nového řetězce je polymeráza schopna detekovat v několika posledních nově nasyntetizovaných nukleotidech chybu, odštěpit všechny nukleotidy i s tím chybným a začít opět syntetizovat nový řetězec již se správnou bází. V případě plus metody je využito nejen schopnosti polymerázy syntetizovat nové řetězce ale i je degradovat. Do roztoku s polymerázou a DNA je přidán pouze jeden z nukleotidů, tudíž u polymerázy převládá degradační aktivita, dokud však nenarazí na místo, kam by měl být zařazený přidaný prekurzor. Poté přepne svoji aktivitu a začne prekurzor neustále doplňovat. Minus metoda byla opačná, roztok obsahoval všechny dNTP až na jeden. Při syntéze komplementárního řetězce k templátu se řetězec vždy prodloužil jen do toho nukleotidu, který chyběl. V obou metodách vznikaly různě dlouhé řetězce, které se po ukončení reakce rozdělily při elektroforéze. Velikou nevýhodou byla enormní spotřeba enzymů a prekurzorů.

O rok později přišel W. Gilbert a A. M. Maxam s jinou metodou sekvenování, které se jinak také říká „chemická metoda“ (Maxam & Gilbert, 1977). Principem je specifické štěpení v sousedství určitých nukleotidů. Pro štěpení byly využity enzymy štěpící pouze za guanosem nebo cytosinem. Pro adenin a tymidin nebyly nalezeny žádné specifické restriktázy, ale byly nalezeny ty, které štěpí za adeninem (A) a guanosem (G), respektive

cytosinem (C) a tymidinem (T). Pokud se tedy na elektroforetickém gelu rozdělili fragmenty a v sloupci restriktázy štěpící za G a A byl proužek a ve vedlejším sloupci pro enzym štěpícím za G byl také proužek, znamenalo to, že na daném místě řetězce se nachází G, pokud v druhém sloupci proužek nebyl na této pozici se nacházel A. Stejně pravidlo platilo i pro C a T. Nevýhodou této metody byla její pracnost a značná toxicita použitých chemikálií, navíc nebylo možné sekvenovat příliš dlouhé molekuly DNA.

Nejvíce používanou se ale stala jiná sekvenovací metoda. Autory byli opět F. Sanger a A. R. Coulson spolu s S. Nicklenem (Sanger, Nicklen, & Coulson, 1977). Využívali při ní terminačních prekurzorů, které byly rozeznávány polymerázou, avšak neměly 3'-hydroxylovou skupinu a proto na ně nebylo možné navázat další nukleotid. Cukerná podstata prekurzorů byla buď arabinosa (arabinosidy), nebo se jednalo o dideoxynukleotidtrifosfáty (ddNTP). V praxi se pak více osvědčily ddNTP než arabinosidy. Do roztoku s templátem, primerem a polymerázou byly přidány všechny nukleotidy a v malém množství vždy ještě terminační prekurzor jednoho z nukleotidů, čímž byl zajištěn vznik různě dlouhých fragmentů analyzovaných pomocí denaturační elektroforézy. Reakce se opakovaly se všemi ddNTP zvlášť a po porovnání výsledků z gelů se určila poloha báze.

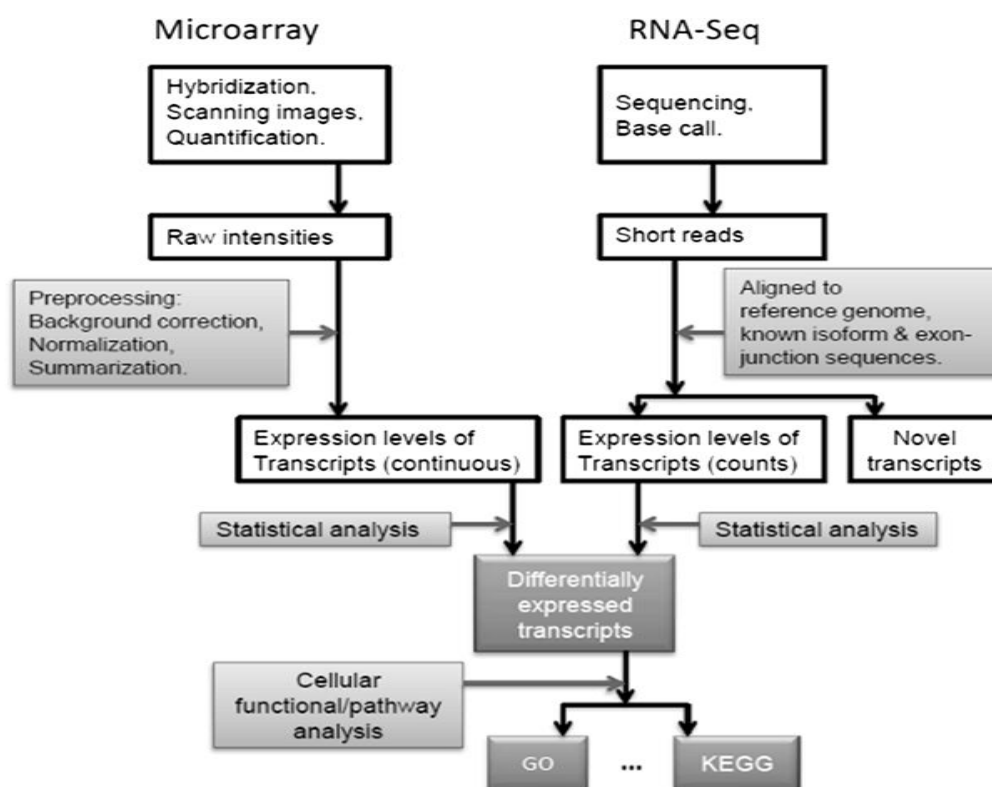
V průběhu času se Sangerova metoda zlepšovala. Zautomatizoval se sběr dat i samotné provádění reakce. Z počátku se používaly radioaktivní značky a později i fluorescenční, čímž reakce nemusely probíhat každá v jiné zkumavce, ale všechny naráz v jedné. Byly objeveny jiné a lepší polymerázy s větší efektivitou nebo více odolné k vysoké teplotě, takže sekvenování se mohlo spojit s PCR reakcí.

Zatímco Sangerova metoda byla založena na přerušení syntézy a detekci vzniklých fragmentů, následující generace analyzuje inkorporaci jednotlivých nukleotidů během syntézy. Tím se celý proces výrazně zrychlí a také zpřesní.

RNA-seq metody

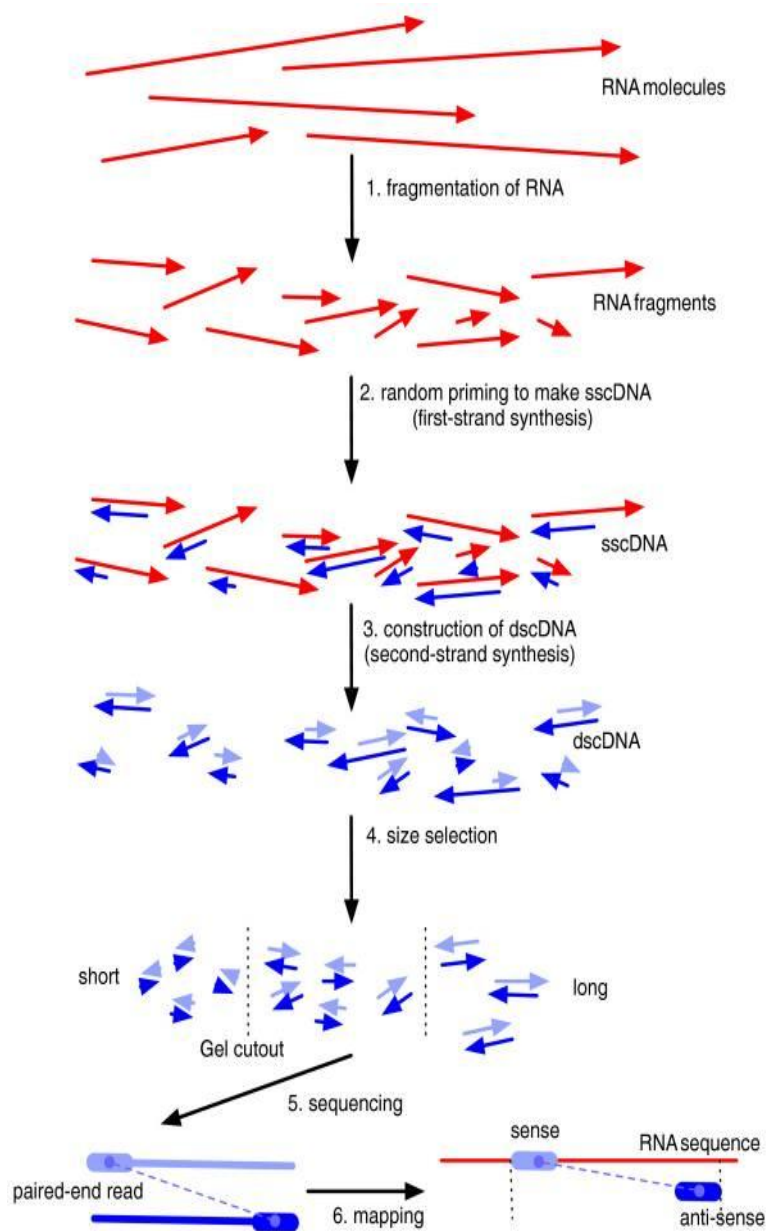
RNA-seq metody mají za úkol paralelně osekvenovat velké množství RNA molekul reverzně přepsaných do cDNA (DNA komplementární k mRNA) pomocí reverzní transkriptázy. Před jejich zavedením byla analýza transkriptomu prováděna pomocí tzv. microarrayů. Microarray je hybridizace nukleové kyseliny s velkým množstvím několik nukleotidů dlouhých sond přichycených na pevném povrchu. Po přichycení jsou fragmenty nukleové kyseliny analyzovány pro zjištění sekvence nebo pro detekci změny v genové sekvenci či expresi ¹.

V současné době jsou microarraye stále více nahrazovány RNA-seq technikami, které mají mnoho výhod. Dají se použít i na neznámý vzorek, microarraye se mohou využít jen na vzorky se známým genomem a detekují jen známé transkripty. RNA-seq metody jsou citlivější, více specifické a mají dynamický rozsah. Postup obou metod znázorňuje Obrázek 1.



Obrázek 1: Přehled postupu microarraye a RNA-seq metod. Převzato z Fang, Martin, & Wang, 2012

Všechny RNA-seq metody sledují velmi podobný postup. Ze vzorku je izolována veškerá RNA, která je následně purifikována, čímž je připravena pro vytvoření RNA knihovny. Pro přípravu knihovny je nutné ve většině případů provést reverzní transkripci a převést RNA na cDNA knihovnu, která je následně amplifikována (Mortazavi, Williams, McCue, Schaeffer, & Wold, 2008).



Obrázek 2: Postup sekvenace RNA transkriptu. (1) Fragmentace RNA, (2) syntéza sscDNA, (3) syntéza dscDNA, (4) rozdělení fragmentů podle velikosti, (5) sekvenování fragmentů, (6) mapování readů. Převzato z Roberts, Trapnell, Donaghey, Rinn, & Pachter, 2011

Před přípravou cDNA knihovny je nutné izolovanou RNA fragmentovat a na vzniklé úseky připojit specifické primery, z nichž probíhá vlastní reverzní transkripce single-stranded cDNA (sscDNA), následována tvorbou komplementárního vlákna DNA, double-stranded cDNA (dscDNA). Molekuly dscDNA jsou poté fragmentovány na menší úseky a takto vzniklé fragmenty jsou sekvenovány. Sekvenované úseky neboli ready jsou následně mapovány do genomu v opačném směru (He, Vogelstein, Velculescu, Papadopoulos, & Kenneth, 2008). Celé schéma zachycuje Obrázek 2.

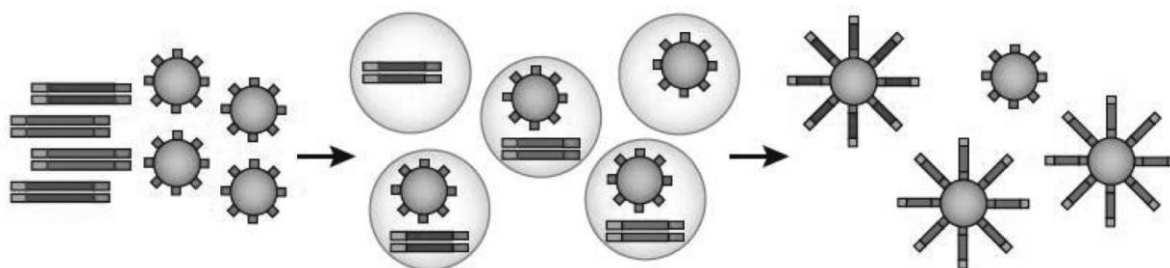
Mezi nejpoužívanější systémy pracující s RNA-seq metodami patří SOLiD systems, Ion Torrent a Illumina².

1. ROCHE/454 Sequencing

1. 1. Popis metody

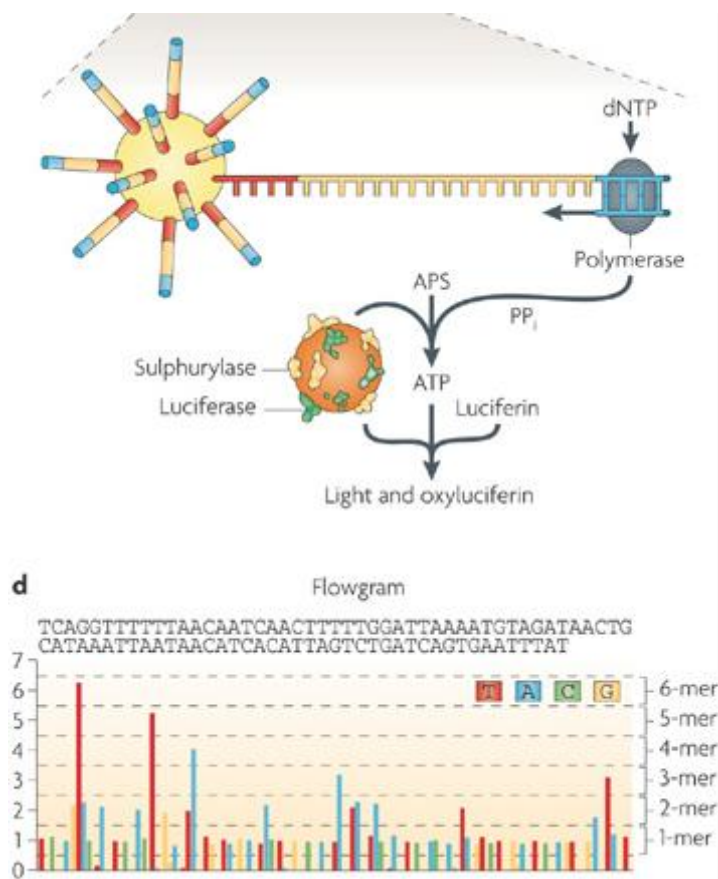
Metoda 454 byla vynalezena Dr. Jonathanem Rothbergem a na trhu se objevila v roce 2005. Jak už bylo popsáno výše, vše začíná izolací RNA z buňky, její purifikací, přepisem na cDNA. Amplifikace je provedena pomocí emulzní PCR potom následuje samotné sekvenování zakončené zpracováním dat.

Na fragmenty dscDNA jsou připojeny adaptéry A a B (tj. pro každý konec DNA je jeden adaptér). DNA je následně zdenaturována a vzniklé single-stranded úseky jsou připojeny pomocí adaptérů na polymerní kuličky. Směs fragmentů DNA a polymerních kuliček se smíchá s emulzí oleje a detergentu v takovém poměru, aby vodný roztok obsahoval jednu kuličku a jeden fragment, nebo jednu kuličku a žádný fragment. Následně jsou fragmenty 5' koncem přichyceny na povrch kuličky a proběhne několik cyklů PCR tak, že fragment hybridizuje s primery navázanými na kuličce. Po rozbití emulze se tak získají kuličky vázající pouze jeden zmnožený fragment v jednořetězcové formě (Dressman, Yan, Traverso, Kinzler, & Vogelstein, 2003). Vzorek s těmito kuličkami je poté aplikován na „PicoTiterPlate“, což je destička s jamkami tak velkými, že se do nich vejde právě jedna kulička s navázanými amplifikovanými úseky DNA. Do jamek jsou pak přisypány tzv. packing beads, které zlepšují signál pro spektrofotometr ³. Schéma je znázorněno na Obrázku 3.



Obrázek 3: Emulzní PCR. Převzato z Oborský, 2013

Ke čtení bází na řetězci se využívá pyrosekvenování, což je technika využívající k detekci bází chemiluminiscenci. Do jamek jsou postupně přidávány roztoky s jednotlivými nukleotidy, které jsou v případě komplementarity s bází na templátu zařazeny polymerázou do nového řetězce. Touto reakcí se uvolní z molekuli báze pyrofosfát, který je enzymem ATP sylfurylázou za přítomnosti APS přeměněn na ATP, jenž je spotřebován při reakci



Obrázek 4: Schéma pyrosekvenování. Převzato z Metzker, 2010

pomocí speciálních softwarů (Ronaghi, Uhlén, & Nyren, 1998, ⁴, ⁵).

1. 2. Výhody a nevýhody

Metoda 454 umožňuje vznik tzv. Long reads (dlouhé ready). To jsou úseky DNA, resp. RNA dlouhé několik set páru bází, v případě 454 to je 400 až 500 bp. Tyto dlouhé ready jsou schopné pokrýt více exonů, snáze se s nimi dají najít unikátní sekvence a celkově je potřeba méně readů pro přečtení celého genomu.

V současné době je tato metoda stále méně používána. Hlavním důvodem je vyšší cena/Gb (mezi \$10 000 - 20 000 na 1 Gb) a v případě úseků s opakujícími se nukleotidy i větší chybovost. To samé platí i o samotných dlouhých readech, kde je větší riziko zanesení chyby při čtení úseku než u readů kratších (Travis, 2011).

I přes své nevýhody byla metoda 454 využita pro sekvenování RNA v různých experimentech (Torres, Metta, Ottenwälder, & Schlötterer, 2008; Mercer et al., 2012), jako například zjištění, zda hostitelské lidské buňky exprimují koreceptor CXCR4 nutný pro infekci buňky virem HIV (Däumer et al., 2011).

luciferázy oxidující luciferin za vzniku oxyluciferinu a záblesku světla. Čím více se inkorporuje bází, tím silnější je záblesk. Baze, které nejsou v reakci využity, zlikviduje enzym apyráza. Místo ATP přidaného do jamek jako zařazující se nukleotid se využívá ATP α S (deoxyadenosin-alpha-thiotrifosfát), aby se zamezilo využití nukleotidu jako substrátu pro oxidaci luciferinu (viz Obrázek 4).

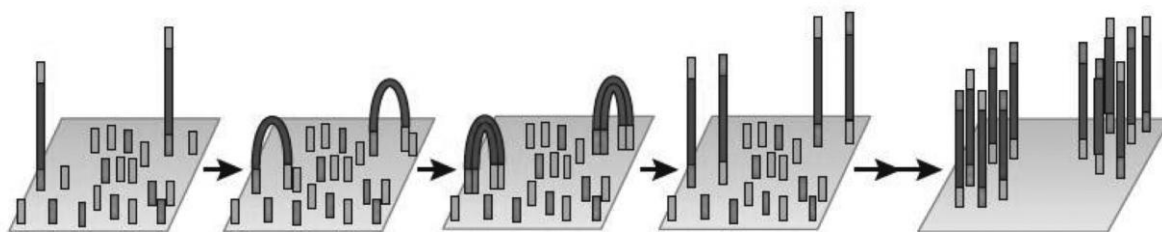
Tímto způsobem je sekvenována každá kulička ve všech jamkách na destičce. Data z osekvenovaných readů jsou poté shromážděna a vyhodnocena

2. Illumina

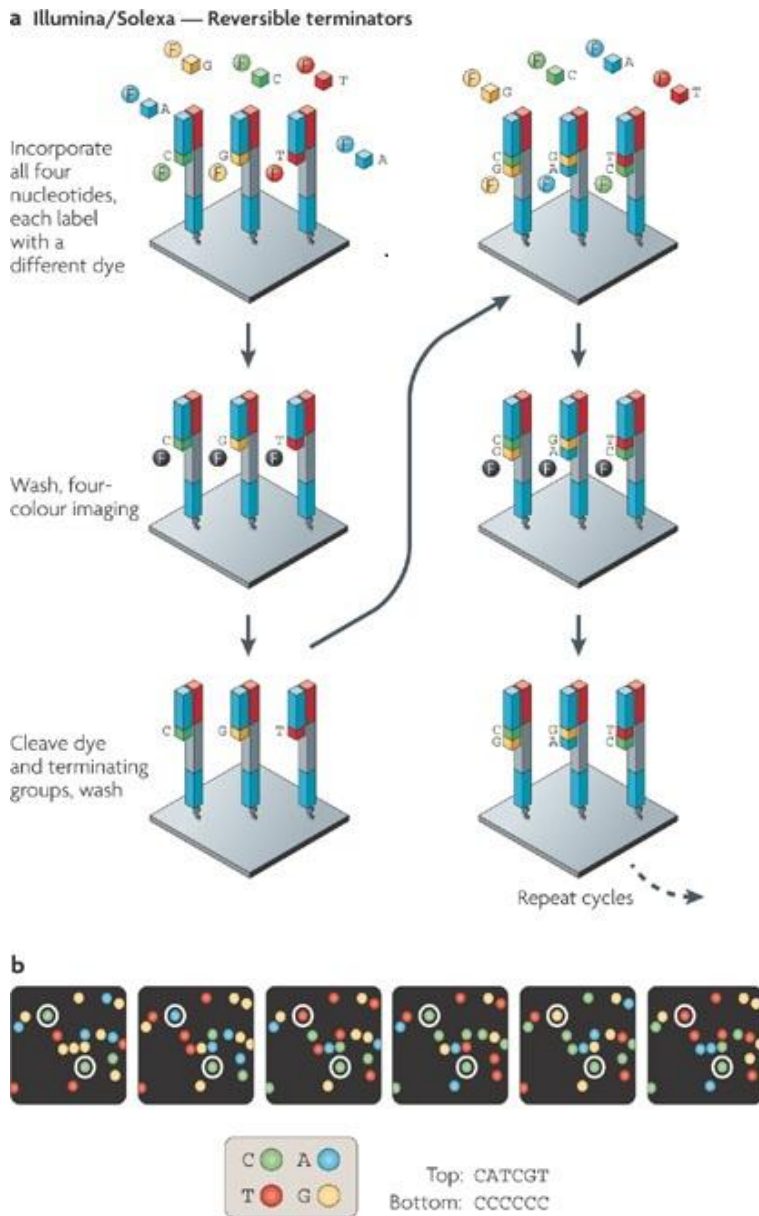
2. 1. Popis metody

Firma Illumina v roce 2007 představila na trhu svou metodu sekvenování Illumina/Solexa. Stejně jako u ostatních sekvenačních technik při ní dochází k amplifikaci DNA pomocí PCR. Nejedná se však o emulzní, nýbrž o „bridge“ neboli můstkovou PCR či amplifikaci na pevné fázi. Jako u 454 metody je následující postup stejný, extrakce RNA, purifikace, přepis RNA do cDNA, poté amplifikace můstkovou PCR, vlastní osekvenování a analýza dat.

Stejně jako emulzní PCR je i začátek reakce u můstkové PCR obdobný. Celá PCR reakce však probíhá při isothermických podmínkách. DNA k sekvenování se fragmentuje, pomocí elektroforézy se vyberou fragmenty o délce 200-300 bp a k nim se pak ligují adaptéry. Na pevnou fázi jsou připojeny dva druhy primerů (komplementární k oběma adaptérům na každém konci fragmentu DNA) ve vysoké hustotě. Následně se na pevnou fázi pomocí adaptérů připojí fragmenty ssDNA tak, aby byly dostatečně daleko od sebe a polymeráza dosyntetizuje druhý řetězec. Dvouřetězcová molekula je vystavena denaturujícím podmínkám a původní templát je odmyt. Imobilizované fragmenty hybridizují volnými konci s primery v okolí a polymeráza opět nasyntetizuje druhý řetězec. Vznikne tak dvouřetězcová molekula připojena oběma konci k podkladu, která projde opět denaturací, při níž vzniknou dvě jednořetězcové molekuly DNA každá přichycena na jiném konci k desce. Tento proces je pak mnohokrát opakován. Takto v několika cyklech PCR vzniknou vzájemně oddělené soubory identických fragmentů DNA (Fedurco, Romieu, Williams, Lawrence, & Turcatti, 2006; Shendure & Hanlee, 2008), ⁶. Průběh PCR znázorňuje Obrázek 5.



Obrázek 5: Můstková PCR. Převzato z Oborský, 2013



Obrázek 6: Illumina sekvenování. Převzato z Metzker, 2010

syntéza identických fragmentů v jednom shluku, kamera detekuje signál z celého shluku. Schéma reakce je na Obrázku 6.

Při analýze dat se k sobě přiloží úseky se stejnou sekvencí, tyto úseky se nazývají kontigy. Kontigy se vzájemně překrývají. Sekvence z kontigů jsou porovnány s referenčním genomem ⁶.

Po amplifikaci jsou reverzní řetězce dsDNA odstřiženy a odmyty. Sekvenování probíhá simultánně na všech vzniklých shlcích amplifikované DNA. Fragменты jsou následně sekvenovány po jednotlivých nukleotidech přidáváním roztoku se všemi fluorescenčně značenými nukleotidy, které jsou reverzně terminální. To znamená, že po inkorporaci báze se na detektoru objeví záblesk barvičky přiřazené ke konkrétnímu nukleotidu, a poté je odstraněna jak fluorescenční značka, tak blokuující skupina na nukleotidu, aby se mohla připojit další báze. Vše se opakuje, dokud není osekvenován celý fragment, paralelně s tím však probíhá

2. 2. Výhody a nevýhody

Metoda Illumina je velice solidní metoda. Patří mezi nejpřesnější na trhu, přestože už se objevili i jiné novější metody a náklady na samotné sekvenování zůstávají nízké (\$7 - 250/Gb). Díky vyvíjení nových sekvenátorů, se stává sekvenování velmi jednoduchým postupem. Podle povahy experimentu je možné zvolit sekvenátor s delšími či kratšími ready.

Avšak právě sekvenátory přináší i nevýhody. Některé z nich jsou velmi drahé nebo je drahé samotné sekvenování (až \$2 000/Gb). U novějších modelů se používají nové chemikálie, u kterých není jisté, jak velká bude chybovost celého sekvenování (Travis, 2011).

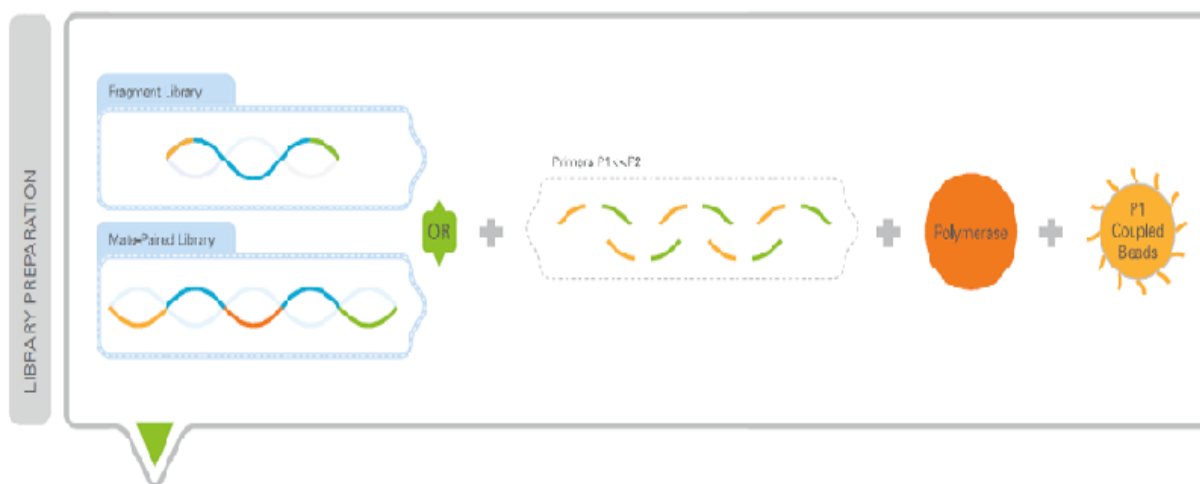
Díky spolehlivosti Illuminy je velmi používanou technikou při sekvenování RNA i DNA (Pan et al., 2012; Imashimizu, Oshima, Lubkowska, & Kashlev, 2013). Dnes už je možné sekvenovat RNA i z velmi malého množství vstupního materiálu (Pan et al., 2012) dokonce i z jedné buňky (Picelli et al., 2014).

3. SOLiD System

3. 1. Popis metody

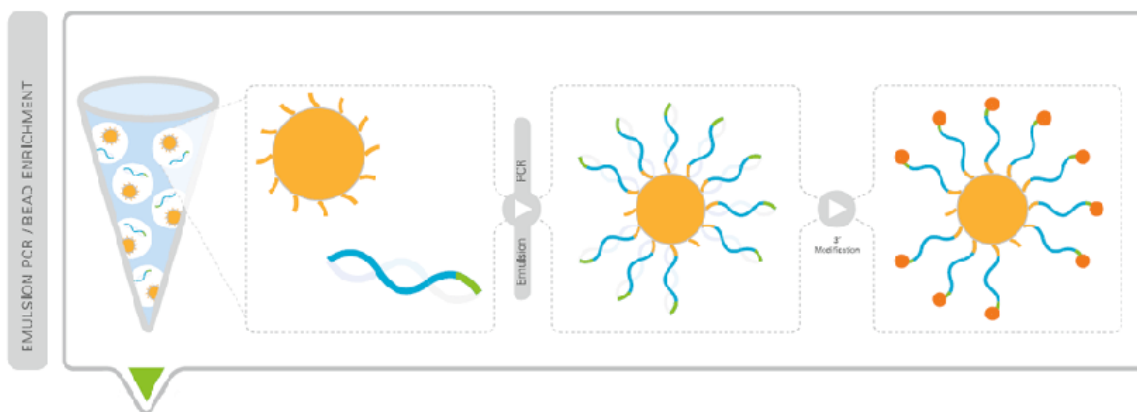
SOLiD system metodu přinesla na trh firma Applied Biosystems v roce 2008. Primárními kroky SOLiD metody jsou příprava enzymů a vzorku (knihovny) následované emulzní PCR a příprava substrátu. Poté následují dva sekvenační kroky, ligace a snímání. A posledním krokem je samotné vyhodnocení dat.

Samotnou přípravu knihovny opět předchází izolace RNA z buňky, její purifikace a reverzní transkripce pro vznik cDNA. Při sekvenování SOLiD metodou jsou dvě možnosti přípravy knihoven. U první se připravuje knihovna z jednoho fragmentu, v druhé pak ze dvou, přičemž je známa vzdálenost mezi fragmenty, díky vložení několik nukleotidů dlouhé sekvence mezi ně. Na konce fragmentů jsou připojeny adaptéry (znázorňuje Obrázek 7). Podle povahy experimentu pak vybíráme první či druhý způsob přípravy knihovny.



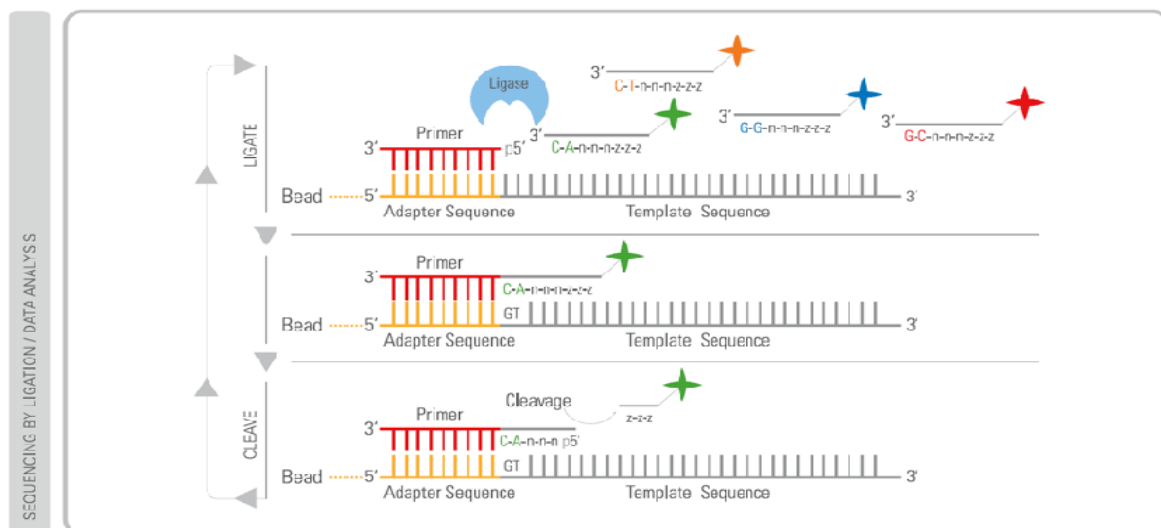
Obrázek 7: Vytvoření knihovny. Může být vytvořena buď knihovna z jednoho fragmentu (nahore), nebo ze dvou fragmentů, které jsou vzájemně propojeny předem definovaným počtem fragmentů (dole). (převzato z⁷)

Po PCR jsou double-strandové fragmenty na kuličkách zdenaturovány a jednotlivé kuličky selektovány. Templáty na vybraných kuličkách jsou poté modifikovány na 3' konci, aby je bylo možné kovalentně přichytit na skleněný podklad (viz Obrázek 8). Při aplikaci kuliček na podklad je možné díky depositním komorám skleněný povrch rozdělit do jedné, čtyř či osmi sekcí.



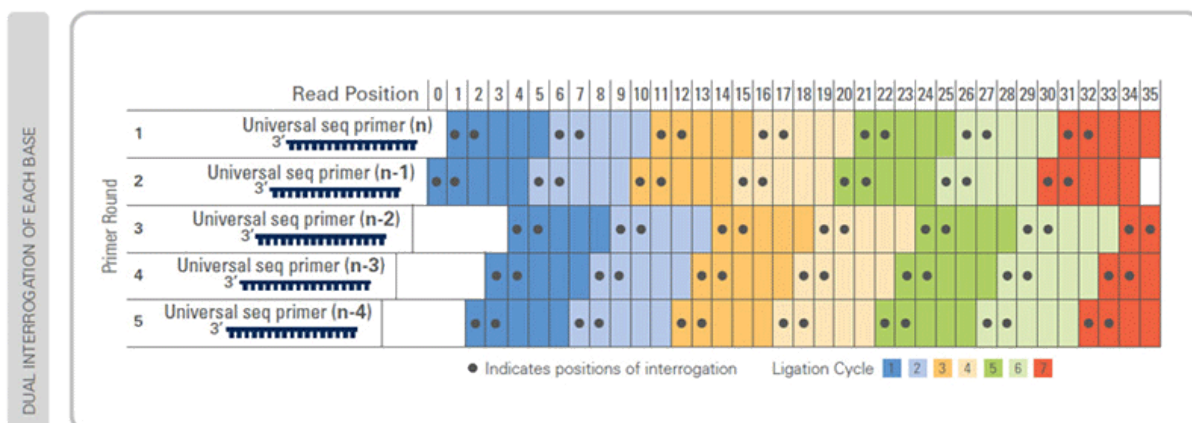
Obrázek 8: Obohacení kuliček. Na kuličky se naváží fragmenty, které jsou poté amplifikovány. Kuličky obalené amplifikovanou cDNA jsou na 3' konci modifikovány. (převzato z ⁷)

Samotné sekvenování je uskutečněno pomocí ligace. Na templáty na kuličkách jsou připojeny primery do místa adaptéru na 5' konci. Do roztoku je dále přidána ligáza s fluorescenčně značenými dvoubázovými sondami (celá sonda je složena z 8 nukleotidů, na prvních dvou místech jsou kombinace dvou nukleotidů, takovýchto kombinací je možné vytvořit celkem 16, další tři místa náleží 3 neurčitým nukleotidům, které párují se všemi bázemi, a poslední tři místa jsou zabrány nukleotidy nesoucí fluorescenční značku). Pokud je jedna ze sond zaligována, odštěpí se její konec, čímž dojde k vyzáření barvy (viz Obrázek 9). Tento postup se opakuje, než se dokončí sekvenace celého fragmentu. Po jeho osekvenování je celý produkt od templátu oddělen a následuje opět další sekvenování začínající primerem, který je posunut o 1 nukleotid.



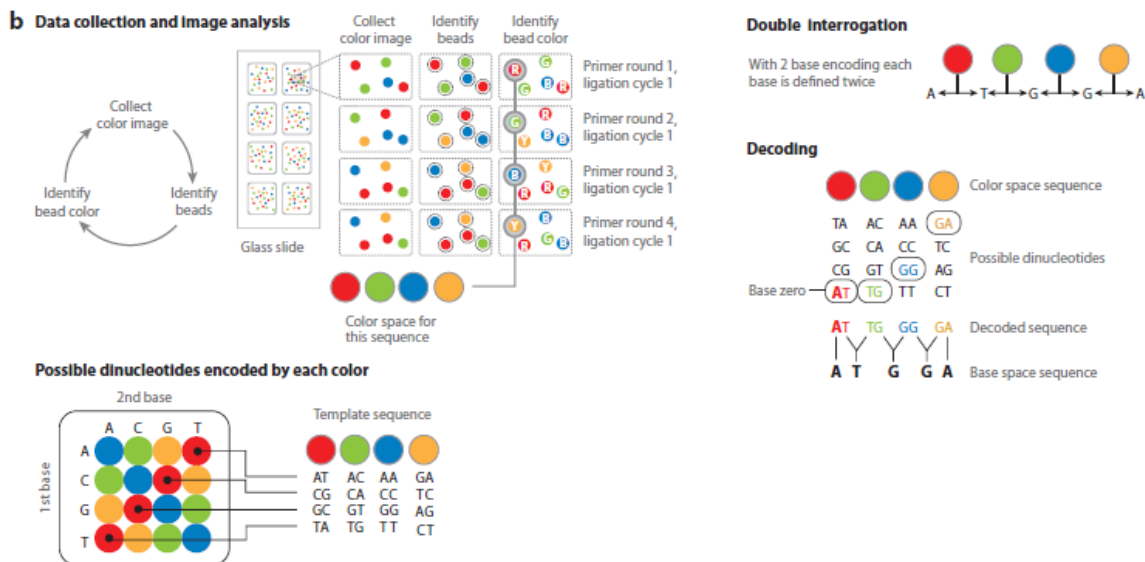
Obrázek 9: Ligace. Enzym ligáza postupně v každém ligačním kole připojí ke vznikajícímu řetězci sondu. Po navázání lze detekovat záblesk. Na konci ligačního kola jsou poslední tři nukleotidy s fluorescenční značkou odstraněny. (převzato z ⁷)

Po proběhnutí pěti kol tohoto tzv. resetování primeru, je každá báze na fragmentu přečtena dvakrát ve dvou nezávislých ligacích při reakci s dvěma rozdílnými primery (viz Obrázek 10). Získaná data jsou následně analyzována ⁷.



Obrázek 10: Výstup z detektoru. V řádcích jsou vlastní primovací kola, při kterých se primer vždy posune o jeden nukleotid. Ve sloupcích jsou jednotlivé čtecí pozice a černé tečky označují báze, které jsou přečteny v konkrétním ligačním kroku. Ligační cykly jsou poté znázorněny odlišným zbarvením políček. (převzato z ⁷)

Získaná data jsou následně analyzována. Při každém barevném záblesku je pořízen snímek. Na snímku jsou poté označeny kuličky a na nich jednotlivé báze. Ke každé barvě jsou přiřazeny čtyři páry bází, postupně pak podle barevných záblesků a pomocí dekodující tabulky je programem určena sekvence fragmentu. Tedy pokud v prvním primovacím kole prvního ligačního cyklu detekujeme červenou, víme, že se na tom to místě může vyskytovat dvojice bází AT, CG, GC nebo TA. V dalším primovacím kole zasvítí zelená ta je pro páry AC, CA, GT či TG. Ve třetím kole se objeví modrá (AA, CC, GG, TT) a ve čtvrtém pak žlutá (GA, TC, AG, CT). Počítač potom podle tabulky vybere páry sekvencí tak, aby vždy druhá báze z jednoho primovacího kola byla shodná s první bází v páru s následujícího kola. Tímto způsobem je osekvenován celý fragment a následně složena sekvence (Obrázek 11).



Obrázek 11: Analýza dat. Převzato z Mardis, 2008

3. 2. Výhody a nevýhody

Velikou výhodou je rozdělení sekvenování do jednotlivých sekcí, které jsou na sobě nezávislé. SOLiD metoda je velmi přesná a pravděpodobnost vzniku chyby velmi nízká. Během jednoho dne je schopna vygenerovat 20-30 Gb dat. Náklady na 1 Gb dat jsou zhruba 70 dolarů.

Naproti tomu při této metodě vznikají relativně krátké ready, což může být problém, pokud hledáme nějaké konkrétní sekvence. Malé ready mají totiž větší pravděpodobnost shody s nějakým segmentem transkriptomu než velké ready. Při *de novo* skládání obsahuje více mezer než data z Illuminy a data jsou také méně distribuovatelná. Další nevýhodou jsou celkově vysoké náklady (Travis, 2011).

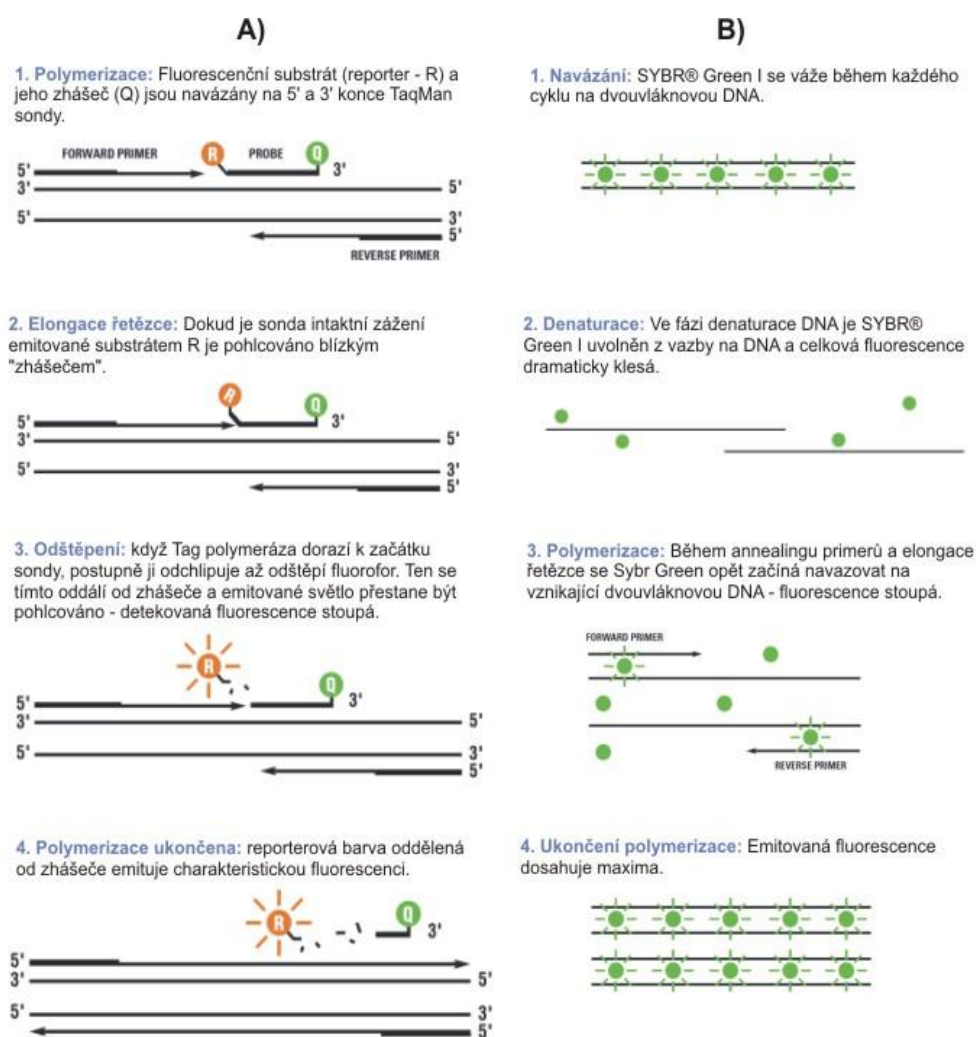
Díky vysoké přesnosti SOLiD metody je jednou z nejpoužívanějších sekvenačních technik. Je možné její pomocí sekvenovat i při velmi malém vstupním množství vzorku (Lao et al., 2009; Tariq, Kim, Jejelowo, & Pourmand, 2011).

4. Ion Torrent

4. 1. Popis metody

Stejně jako SOLiD spadá i metoda Ion Torrent pod firmu Applied Biosystems, resp. pod dceřinou firmu Life Technologies. Ion Torrent se začal komerčně využívat v roce 2010 a je zaměřen na detekci chemických změn při syntéze DNA.

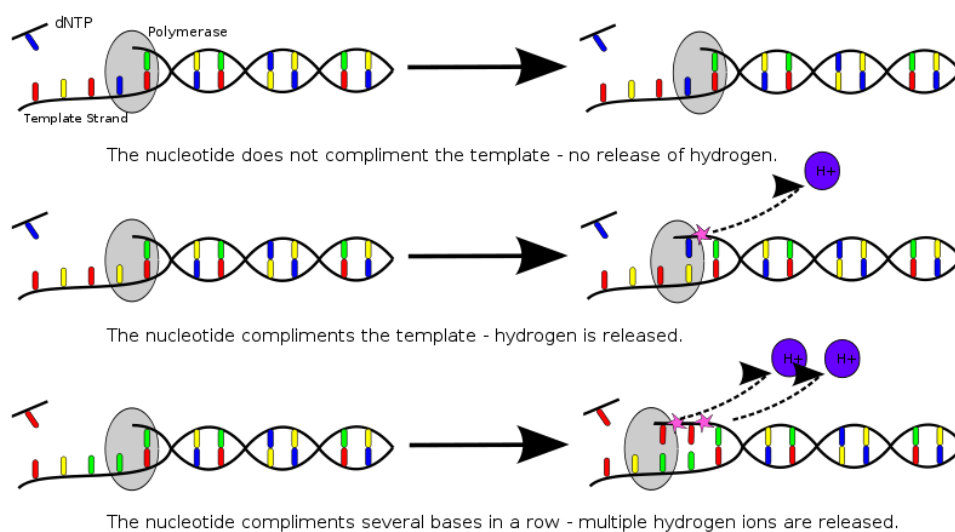
Jako u předchozích metod i Ion Torrent amplifikuje vzniklou cDNA knihovnu, avšak používá k tomu real-time PCR. Tato reakce je podobná emulzní PCR, ale narozdíl od ní je schopná během každého cyklu detekovat množství přírůstků. U klasického PCR se zjišťuje až finální produkt. Aby mohla proběhnout celá reakce, je nutná přítomnost fluorescenčního substrátu, ten se váže na nasynthetizovanou cDNA a podle intenzity vyzáření, pak detekujeme množství nově vytvořených molekul. Data jsou sbírána speciálními termocyklery. Ty v sobě mají zabudovanou optiku pro excitaci substrátu a její detekci. Nejčastěji se využívají



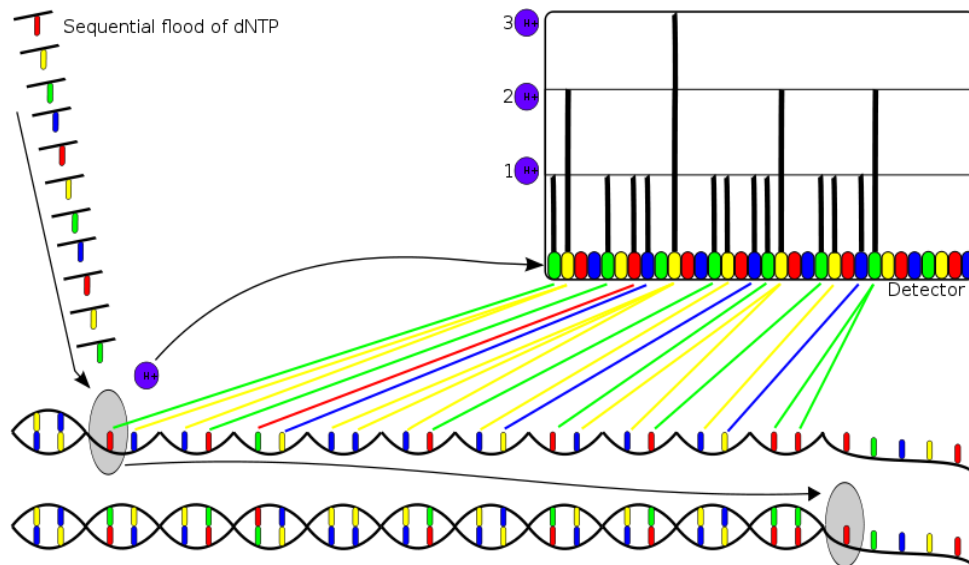
Obrázek 12: Schéma real-time PCR (převzato z ⁸⁾)

termocyklery o 96 jamkách. Používané substráty se dělí do dvou skupin. Nespecifické, které se váží na dsDNA, při vazbě na ssDNA množství vyzařování výrazně klesá. A specifické, tzv. sondy, které obsahují oligo-nukleotidový řetězec, jímž se váží na PCR amplikon. Podstatou jejich funkce, jsou dvě molekuly navázané každá na jiném konci řetězce. První se nazývá fluorofor (značen F či R), druhý pak zhášecí (Q). Pokud je fluorofor v blízkosti zhášecí, tak nesvítí. Ale v situaci, kdy polymeráza odštěpí fluorofor při syntéze druhého vlákna (díky exonukleázové aktivitě ve směru 5'→3') a ten se tedy dostane do dostatečné vzdálenosti od zhášecí, začne fluorofor svítit. Detekce záblesků probíhá kontinuálně v každém PCR cyklu ⁸. Průběh reakce s oběma substráty znázorňuje Obrázek 12.

Po PCR probíhá samotná fáze sekvenování. Ion Torrent analyzuje změnu pH v jamce díky využití polovodičového čipu. Tento čip je pokryt miliony jamek, ve kterých probíhá syntéza komplementárního řetězce k templátu. Čip chemickou změnu detekuje a převede informaci do digitálního signálu, který je počítačem vyhodnocen a přiřazen k příslušné bázi. Při PCR se amplifikují fragmenty na jednotlivé kuličky, které potom po jedné zapadnou do jamek na čipu. Celý čip je následně ponořen do roztoku s konkrétním nukleotidem a enzymy potřebnými k syntéze DNA. Po každé inkorporaci nukleotidu je uvolněno určité množství H⁺ iontů měnící pH roztoku (Obrázek 13). Tato změna zapříčiní vznik napětí, které je detekováno. Pokud není nukleotid zařazen, nic se nestane. Každých 15 vteřin je proces opakován vždy s jiným nukleotidem. V případě inkorporace několika nukleotidů za sebou je pH změna zákonitě větší. Vzniklé napětí je počítačem převedeno na příslušný počet bází (Obrázek 14) ¹⁰.



Obrázek 13: Schéma inkorporace nukleotidu (převzato z ²)



Obrázek 14: Vyhodnocení signálů (převzato z ²⁾)

4. 2. Výhody a nevýhody

Ačkoli je Ion Torrent poměrně nová metoda, jsou náklady na sekvenování i samotná zařízení poměrně malé (do \$100/Gb). Ovládání přístrojů je celkem snadné a jsou dostupné 3 čipy s různým počtem jamek. Některé čipy jsou schopny vytvořit větší množství readů než ostatní metody. Ion Torrent se též řadí k metodám s velice malou chybovostí. Velikou výhodou je razantní zkrácení doby sekvenování. Celý experiment je možné provést v rámci hodin.

Tato metoda není nejvhodnější pro tvorbu dlouhých readů. Novější přístroje s lepšími vlastnostmi jsou drahé a samotné sekvenování může dosahovat částek až 4 000 dolarů za Gb. Často je vhodnější vybrat si pro experiment jinou metodu, kterých je na trhu dostatek, a leckdy jsou vhodnější. (Travis, 2011).

I Ion Torrent technika byla využita při důležitých experimentech, jako sekvenování RNA genomu viru (Neill, Bayles, & Ridpath, 2014), při studiu rakovinných buněk (Schageman et al., 2013) ale i v jiných odvětvích (Kemler et al., 2013).

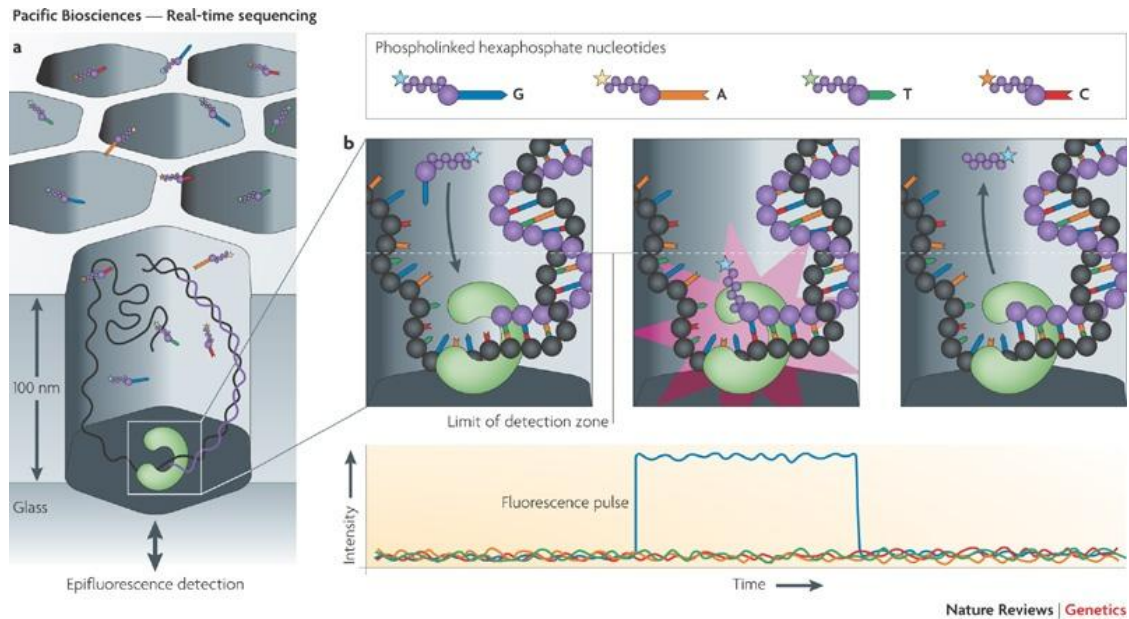
5. Pacific Biosciences

5. 1. Popis metody

Metoda, která byla představena na trhu v roce 2010 firmou Pacific Biosciences, se stala první metodou, která pro sekvenování nepotřebovala amplifikaci pomocí PCR. U všech předchozích metod bylo třeba namnožit fragmenty ve vzorku, čímž se zvětšovala pravděpodobnost zavedení chyby. Technika, pomocí níž jsou sekvenovány jednotlivé molekuly DNA, se nazývá SMRT (Single Molecule Real Time sequencing).

Přestože není potřeba amplifikovat množství vzorku, stále zůstává potřeba převést RNA do cDNA formy pomocí reverzní transkripce. Vzniklá cDNA je poté přenesena na tzv. SMRT Cell, což je destička s desítkami tisíc jamek, kterým se říká ZMW (Zero-Mode Waveguides). ZMW jsou nanofotonické vizualizační komůrky, umožňují detekci inkorporace jednotlivých bazí na pozadí velkého množství ostatních nukleotidů v roztoku. ZMW jsou pokryté hliníkovým filmem a osvětlovány světlem procházejícím jejich skleněným dnem. Objem ZMW je 20 zeptolitřů, což je 20×10^{-21} litru, a vlnová délka světla je právě tak velká, aby mohla projít skrz dno jamky. Jak světlo postupuje, slábne jeho intenzita, tedy procházející paprsek pronikne jen do spodních 20-30 nm. To umožní detekci záblesku i v tak malých objemech a zároveň je vyloučena detekce záření z ostatních nenavázaných nukleotidů v roztoku.

Na dnu každé ZMW je připevněna DNA polymeráza s templátem. Během syntézy komplementárního řetězce, jsou inkorporovány nukleotidy označené každý svou fluorescenční značkou na třetím fosfátu (dosavadní metody označovaly v nukleotidu přímo báze). Tedy když je připojen nukleotid k řetězci a je odštěpen pyrofosfát, vyzáří se záblesk světla odpovídající příslušnému nukleotidu (schematicky znázorněno na Obrázku 15).



Obrázek 15: Schéma sekvenace metodou SMRT. Převzato z Metzker, 2010

Takto jsou sekvenovány fragmenty DNA v každé jamce na destičce. Počítač sesbírá data ze všech jamek a pomocí softwarů poskládá sekvenci dohromady ¹¹.

5. 2. Výhody a nevýhody

Velké plus metody je samotné SMRT, kdy je možné osekvenovat DNA či RNA izolované přímo z buňky bez potřeby amplifikace. Další výhodou jsou poměrně dlouhé ready a krátká doba sekvenování.

I když se zdá, že je metoda velice přesná, není tomu tak, navíc během sekvenování sice vznikají dlouhé ready, ale je jich málo. Mimo to je tato metoda relativně drahá (cca \$3 500/Gb) (Travis, 2011).

PacBio metoda byla využita v nemálo experimentech, jako například skládání lidského transkriptomu (Au, Underwood, Lee, & Wong, 2012; Sharon, Tilgner, Grubert, & Snyder, 2013) nebo získání full-length cDNA z embryonálních kmenových buněk člověka spolu s Illuminou (Au et al., 2013).

6. Oxford Nanopore

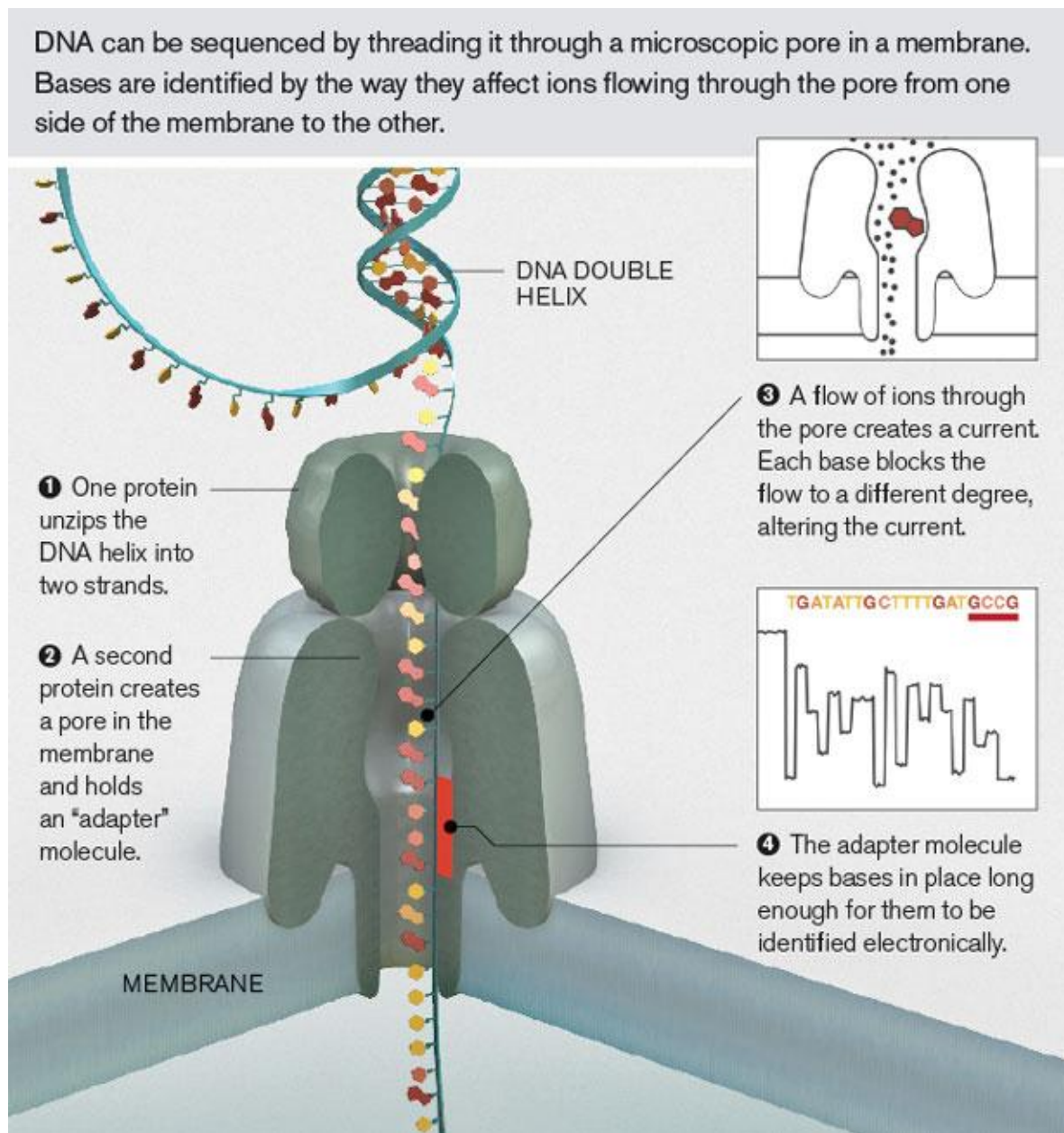
6. 1. Popis metody

Nejnovější metodou na trhu sekvenování je Oxford Nanopore, komerčně dostupný od roku 2012, nicméně zmínky o sekvenování přes proteinový nanopór se objevily už v roce 2010 (Olasagasti et al., 2010). Oxford Nanopore je technika, kterou se dají sekvenovat nejen řetězce nukleových kyselin ale také proteiny nebo jiné molekuly.

Nanopore metoda je vyvinuta, aby přímo elektronicky analyzovala každou molekulu, která projde přes uměle vytvořený proteinový pór. Póry jsou umístěny v mikrojamkách na arrayčipu, který je vyroben z polovodičového materiálu. Každá jamka má svoji vlastní elektrodu měřící změnu potenciálu napětí na membráně, vyrobené ze syntetických polymerů, ve které je ukotven pór. Na jednu jamku připadá jeden pór a membrána, již je připevněn, pokrývá celé dno jamky. Celý arrayčip je umístěn do kazety na jedno použití, která obsahuje nanopóry pro detekci specifických molekul (DNA/RNA, proteiny či malé molekuly). Kazeta je poté umístěna do přístroje („node“ - uzel) pro zpracování a analýzu dat. Po spuštění každý nanopór detekuje molekuly nezávisle na ostatních. Nody pro vyhodnocení potřebují být napojeny na virtuální síť pro komunikaci mezi sebou nebo s úložištěm dat na síti. Mohou pracovat jednotlivě nebo propojeny mezi sebou, což zrychlí detekci molekul. Nody také zvládají kontrolovat fyzikální podmínky během experimentu pomocí zpětné vazby. Je vyvinuto také zařízení pro detekci malého množství molekul, které se pomocí USB kabelu dá připojit k počítači. Standartní kazeta obsahuje 96 jamek, ale existují i verze s menším či větším počtem jamek ¹².

Pro sekvenování nukleových kyselin (NK) Oxford Nanopore stávající metodu sekvence trochu upravil a nazval jí „strand sequencing“ tedy sekvenování řetězce. Pro detekci nukleotidů se opět používá nanopór. Pór se skládá z dvou částí, první je ukotvena v membráně, vypadá jako kanál o průměru několik nanometrů, jímž prochází molekuly přes pór, druhá část mimo membránu usměřňuje molekuly do kanálu. I zde je pór připevněn na membránu ze syntetických polymerů na dně jamky, která má vysoký elektrický odpor. Během sekvenování molekuly NK je nedotčený řetězec posouván přes pór. Na pór v membráně nasedne protein s navázanou dvoušroubovicí NK, který je navržen na rozplétání dvouřetězcové molekuly právě tak, aby přes pór procházela jedna báze za určitý čas. Po každém projití báze na řetězci se změní napětí na membráně, které je pro jednotlivé báze charakteristické. Napětí je změřeno a počítač pomocí softwaru identifikuje příslušnou bázi.

Celý systém je schopen číst oba řetězce, sense i anti-sense. Po přečtení jednoho vlákna, je druhé stále připojeno k rozplétajícímu proteinu, tudíž až projde konec prvního řetězce, začne protein vsouvat do póru druhý řetězec¹³. Schéma sekvenování zobrazuje Obrázek 16.



Obrázek 16: Strand sequencing skrz nanopór (převzato z¹⁴)

6. 2. Výhody a nevýhody

Nanopore metoda umožňuje vznik extrémně dlouhý readů za poměrně nízkou cenu (do 50 dolarů za 1 Gb, avšak MinION je asi dvacetkrát dražší). Výhodou jsou i MinION analyzátory připojitelné pomocí USB a zabírající méně místa než myš u počítače. Nezanedbatelná je i možnost čtení obou řetězců dvoušroubovice NK.

Díky tomu, že je Nanopore relativně nová metoda na poli sekvenování NK, nejsou přístupná spolehlivá data o chybovosti při čtení bází. Společnost uvádí chybovost 4%, ale i to je více než jiné komerčně dostupné metody. Navíc jak GridION i MinION přístroje jsou stále ve vývoji, jejich spolehlivost tedy není zcela jistá (Travis, 2011).

Jak už bylo řečeno Oxford Nanopore je naprostou novinkou, tudíž je obtížné najít práce, které by ji užívali. Nanopore metoda se využívá spíše pro analýzu molekul proteinů (Rosen, Rodriguez-Larrea, & Bayley, 2014), i když pro sekvenování DNA byla též využita (Olasagasti et al., 2010).

Metody umožňující analýzu genové exprese pouze z jedné buňky

STRT-seq

STRT-seq (Single-cell Tagged Reverse Transcription) je metoda využívající výměny templátu RNA za cDNA („template-switching“) při reverzní transkripci. K sekvenaci RNA je využívána metoda Illumina.

Izolovaná mRNA je reverzně transkribována pomocí oligo-dT primeru, které obsahují unikátní označené adaptéry (adaptéry jsou bar-kódované, tj. označené pro pozdější rozlišení vzorku) a primery pro syntézu cDNA. Na první řetězec cDNA je připojeno 3-6 cytosinů a oligo-dT primer je poté využit pro template-switching. Díky primerům je produkt amplifikován pomocí PCR a ukotven na kuličky. Následně je fragmentován a k jeho konci se připojí poly-A „ocas“. Na volný konec je nalogován Illumina P2 adaptér, P1 adaptér se objeví při PCR kroku. Konečná knihovna je vytvořena využitím P1 primeru a náhodného primeru. Každý read začíná bar-kódem následovaným 3-6 cytosiny. Celá knihovna je nakonec osekvenována (Islam et al., 2011).

SMART-seq

SMART-seq (Switching Mechanism At the 5' end of the RNA Template), která používá fragmentace cDNA pro získání celkové cDNA buňky. Pro samotné sekvenování se využívá opět metoda Illumina, jediné, co se mění, je příprava cDNA knihovny.

Na začátku se izoluje RNA z buňky, následně je reverzně přepsána od cDNA, na jejíž konec je netemplátově přidáno několik C nukleotidů. Poté je RNA templát oddělen a stává se templát ze vzniklé cDNA, ke které je zároveň připojen speciální SMARTer IIA adaptér. Takto vzniklé fragmenty se amplifikují pomocí PCR. Po proběhnutí 12-18 kol PCR je vzniklá dscDNA nastříhána. Konce jsou opraveny (přidáním bází), ale zároveň proběhne tzv. tagmentování (tagmentation), což je reakce, při které enzym transpozáza napadne DNA řetězec a vloží do něj syntetické nukleotidy. Na konce vzniklých molekul jsou navázány další adaptéry a tím je cDNA knihovna připravena pro sekvenování (Ramsköld et al., 2012).

CEL-seq

CEL-seq znamená „Cell Expression by Linear amplification and sequencing“, tedy analýza genové exprese buňky pomocí lineární amplifikace a sekvenování. Jako u SMART-seq se k sekvenování využívá Illumina, pouze s jiným postupem přípravy cDNA knihovny.

Jednotlivé buňky jsou vloženy do zkumavek a jsou k nim připojeny unikátní bar-kódované adaptéry pro reverzní transkripci. Poté, co se nasyntetizuje druhý řetězec, jsou vzorky převedeny na IVT (*in vitro* transkripce). Amplifikovaná RNA je fragmentována, purifikována a nakonec k ní jsou připojeny adaptéry na 3' konec. Před samotnou sekvenací pomocí upraveného protokolu od firmy Illumina pro RNA jsou z roztoku vybrány ty molekuly, které obsahují oba adaptéry. Takto vzniklá cDNA knihovna je poté sekvenována (Hashimshony, Wagner, Sher, & Yanai, 2012).

Quartz-seq

Stejně jako předešlé metody Quartz-seq využívá pro sekvenování molekul Illuminu, ale je možné použít i microarraye.

Prvním krokem pro přípravu knihovny je jako vždy reverzní transkripce. Následuje odstřížení primeru exonukleázou I (díky tomu nevznikají během amplifikace žádné vedlejší produkty). Dalším bodem je adice poly-A „ocasů“ na 3' konec prvního řetězce cDNA. Pak je nasyntetizován druhý řetězec za použití tagovacího primeru (tagy jsou sekvence označující NK), tím je připraven substrát pro nadcházející amplifikaci. Při obohacené PCR jsou potlačeny PCR primery, aby vzniklo dostatečné množství DNA pro následné sekvenování (Sasagawa et al., 2013).

Závěr

Ze všech metod uvedených v této práci se jako nejlepší možné pro sekvenaci RNA jeví Illumina díky své přesnosti, variabilitě a cenové dostupnosti. V dnešní době už je schopna zpracovat a osekvenovat RNA z jakéhokoli vzorku dokonce i z jedné buňky. Pomocí několika druhů kitů je možné z buňky vyizolovat mRNA, rRNA, malé RNA, celkovou RNA buňky nebo RNA o nízké kvalitě. O její spolehlivosti vypovídá i celá řada experimentů, ve kterých byla využita.

Na druhém místě jsou metody Ion Torrent a Oxford Nanopore. Každá z nich má svoje nevýhody. Ion Torrent je kvalitní technikou, ale v porovnání s Illuminou je zásadně méně přesný a cenově se nevyplatí, i když je mnohem rychlejší. Nanopore je metoda budoucnosti, má velký potenciál, avšak o její přesnosti se dá pouze spekulovat. Je nutné provést ještě mnoho pokusů a měření. Samotná sekvenace zabere málo času a také není drahá.

Ostatní metody jsou většinou použitelné pro potřeby konkrétních experimentů. Bývají velmi drahé nebo jejich chybovost je příliš vysoká. V dnešní době se dají nalézt jiné techniky, které jsou optimálnější ve všech směrech.

Literatura

- Au, K. F., Sebastiano, V., Afshar, P. T., Durruthy, J. D., Lee, L., Williams, B. a, ... Wong, W. H. (2013). Characterization of the human ESC transcriptome by hybrid sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(50), E4821–E4830.
- Au, K. F., Underwood, J. G., Lee, L., & Wong, W. H. (2012). Improving PacBio long read accuracy by short read alignment. *PloS One*, *7*(10), e46679.
- Däumer, M., Kaiser, R., Klein, R., Lengauer, T., Thiele, B., & Thielen, A. (2011). Genotypic tropism testing by massively parallel sequencing: qualitative and quantitative analysis. *BMC Medical Informatics and Decision Making*, *11*(30), 1–8.
- Dressman, D., Yan, H., Traverso, G., Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (2003). Transforming single DNA molecules into fluorescent magnetic particles for detection and enumeration of genetic variations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(15), 8817–8822.
- Fang, Z., Martin, J., & Wang, Z. (2012). Statistical methods for identifying differentially expressed genes in RNA-Seq experiments. *Cell & Bioscience*, *2*(1), 26.
- Fedurco, M., Romieu, A., Williams, S., Lawrence, I., & Turcatti, G. (2006). BTA, a novel reagent for DNA attachment on glass and efficient generation of solid-phase amplified DNA colonies. *Nucleic Acids Research*, *34*(3), e22.
- Hashimshony, T., Wagner, F., Sher, N., & Yanai, I. (2012). CEL-Seq: single-cell RNA-Seq by multiplexed linear amplification. *Cell Reports*, *2*(3), 666–673.
- He, Y., Vogelstein, B., Velculescu, V. E., Papadopoulos, N., & Kenneth, W. (2008). The Antisense Transcriptomes of Human Cells. *Science*, *322*(5909), 1855–1857.
- Imashimizu, M., Oshima, T., Lubkowska, L., & Kashlev, M. (2013). Direct assessment of transcription fidelity by high-resolution RNA sequencing. *Nucleic Acids Research*, *41*(19), 9090–9104.
- Islam, S., Kjällquist, U., Moliner, A., Zajac, P., Fan, J.-B., Lönnerberg, P., & Linnarsson, S. (2011). CEL-Seq: single-cell RNA-Seq by multiplexed linear amplification. *Genome Research*, *21*(7), 1160–1167.
- Kemler, M., Garnas, J., Wingfield, M. J., Gryzenhout, M., Pillay, K.-A., & Slippers, B. (2013). Ion Torrent PGM as tool for fungal community analysis: a case study of endophytes in *Eucalyptus grandis* reveals high taxonomic diversity. *PloS One*, *8*(12), e81718.
- Lao, K. Q., Tang, F., Barbacioru, C., Wang, Y., Nordman, E., Lee, C., ... Surani, M. A. (2009). mRNA-sequencing whole transcriptome analysis of a single cell on the SOLiD system. *Journal of Biomolecular Techniques*, *20*(5), 266–271.

- Mardis, E. R. (2008). Next-generation DNA sequencing methods. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 9, 387–402.
- Maxam, M. A., & Gilbert, W. (1977). A new method for sequencing DNA. *Biochemistry*, 2474(2), 560–564.
- Mercer, T. R., Gerhardt, D. J., Dinger, M. E., Crawford, J., Trapnell, C., Jeddloh, J. a, ... Rinn, J. L. (2012). Targeted RNA sequencing reveals the deep complexity of the human transcriptome. *Nature Biotechnology*, 30(1), 99–104.
- Metzker, M. L. (2010). Sequencing technologies — the next generation. *Nature Reviews Genetics*, 11(1), 31–46.
- Mortazavi, A., Williams, B. A., McCue, K., Schaeffer, L., & Wold, B. (2008). Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nature Methods*, 5, 621–628.
- Neill, J. D., Bayles, D. O., & Ridpath, J. F. (2014). Simultaneous rapid sequencing of multiple RNA virus genomes. *Journal of Virological Methods*, 201, 68–72.
- Oborský, P. (2013). Sekvenování DNA. *Bioprospekt*, 1, 5–7.
- Olasagasti, F., Lieberman, K. R., Benner, S., Cherf, G. M., Dahl, J. M., Deamer, D. W., & Akeson, M. (2010). Replication of individual DNA molecules under electronic control using a protein nanopore. *Nature Nanotechnology*, 5, 798–806.
- Pan, X., Durrett, R. E., Zhu, H., Tanaka, Y., Li, Y., Zi, X., & Marjani, S. L. (2012). Two methods for full-length RNA sequencing for low quantities of cells and single cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(2), 594–599.
- Picelli, S., Faridani, O. R., Björklund, A. K., Winberg, G., Sagasser, S., & Sandberg, R. (2014). Full-length RNA-seq from single cells using Smart-seq2. *Nature Protocols*, 9(1), 171–181.
- Ramsköld, D., Luo, S., Wang, Y.-C., Li, R., Deng, Q., Faridani, O. R., ... Sandberg, R. (2012). Full-Length mRNA-Seq from single cell levels of RNA and individual circulating tumor cells. *Nature Biotechnology*, 30(8), 777–782.
- Roberts, A., Trapnell, C., Donaghey, J., Rinn, J. L., & Pachter, L. (2011). Improving RNA-Seq expression estimates by correcting for fragment bias. *Genome Biology*, 12(3), R22.
- Ronaghi, M., Uhlén, M., & Nyrén, P. (1998). DNA SEQUENCING: A Sequencing Method Based on Real-Time Pyrophosphate. *Science*, 281(5375), 363–365.
- Rosen, C. B., Rodriguez-Larrea, D., & Bayley, H. (2014). Single-molecule site-specific detection of protein phosphorylation with a nanopore. *Nature Biotechnology*, 32, 179–181.
- Sanger, F., & Coulson, A. (1975). A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J. Mol. Biol.*, 94, 441–448.

- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating. *Biochemistry*, *74*(12), 5463–5467.
- Sasagawa, Y., Nikaido, I., Hayashi, T., Danno, H., Uno, K. D., Imai, T., & Ueda, H. R. (2013). Quartz-Seq: a highly reproducible and sensitive single-cell RNA sequencing method, reveals non-genetic gene-expression heterogeneity. *Genome Biology*, *14*(4), R31.
- Sharon, D., Tilgner, H., Grubert, F., & Snyder, M. (2013). A single-molecule long-read survey of the human transcriptome. *Nature Biotechnology*, *31*(11), 1009–1014.
- Shendure, J., & Hanlee, J. (2008). Next-generation DNA sequencing. *Nature Biotechnology*, *26*(10), 1135–1145.
- Schageman, J., Zeringer, E., Li, M., Barta, T., Lea, K., Gu, J., ... Vlassov, A. V. (2013). The complete exosome workflow solution: from isolation to characterization of RNA cargo. *BioMed Research International*, *2013*, 1–15.
- Tariq, M. A., Kim, H. J., Jejelowo, O., & Pourmand, N. (2011). Whole-transcriptome RNAseq analysis from minute amount of total RNA. *Nucleic Acids Research*, *39*(18), e120.
- Torres, T. T., Metta, M., Ottenwalder, B., & Schlotterer, C. (2008). Gene expression profiling by massively parallel sequencing. *Genome Research*, *18*(1), 172–177.
- Travis, G. C. (2011). Field guide to next-generation DNA sequencers. *Molecular Ecology Resources*, *11*(5), 759–769.
- Zobel, C. R., & Beer, M. (1961). Electron stains. I. Chemical studies on the interaction of DNA with uranyl salts. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, *10*(16), 335–346.

Elektronické zdroje

1. Microarrays. *National Center for Biotechnology Information Search database Search term* [online]. 2001, 27. dubna 2014 [cit. 2014-04-27]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/probe/doc/TechMicroarray.shtml>
2. CORNEY, David C. RNA-seq Using Next Generation Sequencing. *Labome* [online]. 2013, 2014-03-29 [cit. 2014-04-27]. Dostupné z: <http://www.labome.com/method/RNA-seq-Using-Next-Generation-Sequencing.html>
3. Genome Sequencer FLX System Workflow. In: *Youtube* [online]. 29. 10. 2008 [vid. 2014-04-24]. Kanál uživatele [DaftPunkCA](#). Dostupné z: <http://www.youtube.com/watch?v=bFNjxKHP8Jc>
4. 1st, 2nd, and 3rd Generation Genome Sequencing Technologies. In: *Youtube* [online]. 29. 4. 2012 [vid. 2014-04-24]. Kanál uživatele [ImGenTechWPI](#). Dostupné z: http://www.youtube.com/watch?v=_ApDinCBt8g
5. Pyrosequencing. In: *Youtube* [online]. 8. 12. 2012 [vid. 2014-04-24]. Kanál uživatele [Kholood Odeh](#). Dostupné z: http://www.youtube.com/watch?v=UganL_z_m5E
6. Illumina Sequencing Technology. In: *Youtube* [online]. 23. 10. 2013 [vid. 2014-04-24]. Kanál uživatele [IlluminaInc](#). Dostupné z: <http://www.youtube.com/watch?v=womKfikWlxM>
7. Overview of SOLiD™ Sequencing Chemistry. *Applied Biosystems* [online]. 2013, 17. září 2013 [cit. 2014-04-27]. Dostupné z: <http://www.appliedbiosystems.com/absite/us/en/home/applications-technologies/solid-next-generation-sequencing/next-generation-systems/solid-sequencing-chemistry.html>
8. Real-time PCR. *Molekulárně biologické metodiky ve farmakologii* [online]. 2007, 15. ledna 2007 [cit. 2014-04-26]. Dostupné z: <http://web.lfhk.cuni.cz/farmakol/interakce/micuda/real-PCR.htm>
9. Ion semiconductor sequencing. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2011, last modified on 29 January 2014 [cit. 26. 4. 2014]. Dostupné z: http://en.wikipedia.org/wiki/Ion_semiconductor_sequencing
10. Ion Torrent™ next-gen sequencing technology. In: *Youtube* [online]. 14. 5. 2013 [vid. 2014-04-25]. Kanál uživatele [iontorrent](#). Dostupné z: <http://www.youtube.com/watch?v=MxkYa9XCvBQ>
11. Introduction to SMRT Sequencing. In: *Youtube* [online]. 5. 12. 2011 [vid. 2014-04-26]. Kanál uživatele [PacificBiosciences](#). Dostupné z: <http://www.youtube.com/watch?v=NHCJ8PtYCFc>

12. Movies: GridION part 1: Nanopore sensing and an introduction to the GridION system. *Oxford Nanopore Technologies* [online]. 2014, 27. 4. 2014 [cit. 2014-04-27]. Dostupné z: <https://www.nanoporetech.com/news/movies#movie-21-gridion-part-1>
13. Movies: Nanopore DNA sequencing. *Oxford Nanopore Technologies* [online]. 2014, 27. 4. 2014 [cit. 2014-04-27]. Dostupné z: <https://www.nanoporetech.com/news/movies#movie-24-nanopore-dna-sequencing>
14. Nanopore Sequencing. *MIT Technology Review* [online]. 2012 [cit. 2014-04-27]. Dostupné z: <http://www2.technologyreview.com/article/427677/nanopore-sequencing/>