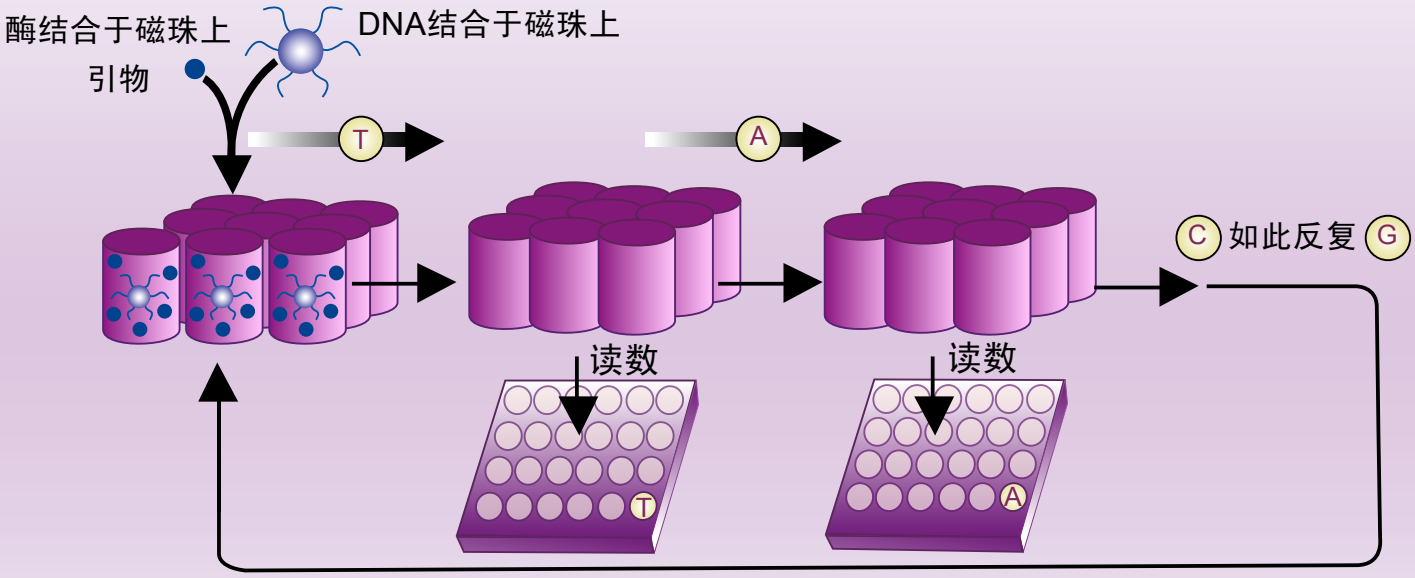
测序新技术速览

454技术 样品制备

将基因组打成较短的DNA片段，再将片段与接头相连，以便使其更容易与磁珠结合在一起（一个DNA片段结合于一个磁珠）。将PCR产物包被于“油包水”的乳化剂中，每一滴乳化剂内除PCR产物外，还含有一个结合了一个DNA片段的磁珠，这样，PCR扩增过程就可以在每一滴乳化剂内独立进行，而没有其它竞争性或者污染性序列的影响。如此，使整个DNA片段进行平行扩增。扩增反应完成后，每个磁珠上的DNA片段拥有了成千上万个相同的拷贝。经过富集以后，这些片段仍然和磁珠结合在一起，随后就可以放入到PicoTiterPlate板（一种光纤载板）的样品孔内供后继测序使用了。

焦磷酸测序（Pyrosequencing）

在光纤PicoTiterPlate板样品孔内还有测序过程所需的酶类及引物（引物与DNA片段末端的接头序列互补），当未经荧光标记的核苷酸流经过样品孔时，每次只允许一个互补dNTP接入，进行互补新链的合成。每当一个核苷酸连接到新链上时，就会释放一分子的焦磷酸盐（PPi），而后PPi与相应底物反应形成一分子ATP，ATP再驱动荧光素酶转变为氧化荧光素酶，而氧化荧光素酶可以发出可见光，可被检测仪器捕获，形成峰图。该序列阅读长度（read length）介于100到150个核苷酸之间。（具体原理见文后扩展阅读）

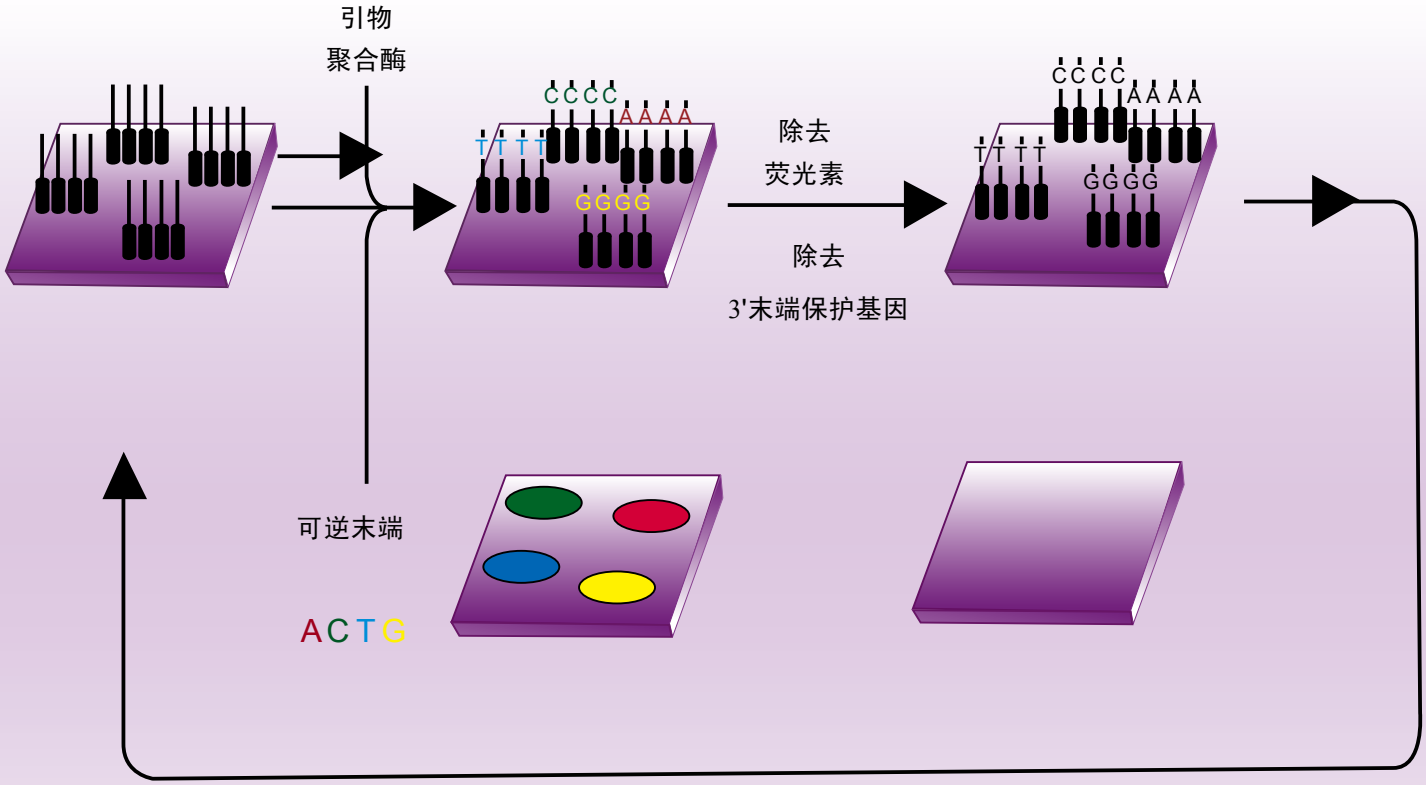


图片来源：*Katie Ris-Vicari*

Solexa测序技术 样品制备

将基因组DNA打成几百个碱基（或更短）的小片断，在片断的两个末端加上接头，利用专利的芯片：其芯片表面连接有一层单链引物，DNA片断成单链后通过芯片表面的引物碱基互补被一端“固定”在芯片上，引物扩增使得单链DNA成为双链，该双链变性后成为单链，其一端“固定”在芯片上，另外一端（5'或3'）随机和附近的另外一个引物互补，被“固定”住，形成“桥”。这样的反应在上千万DNA单分子上发生，形成的单链桥以周围的引物为扩增引物，在芯片表面进行扩增，形成双链。双链经变性成单链，再次形成桥，成为下一轮扩增的模板继续扩增，经过30轮的扩增，每个单分子得到了1000倍扩增，成为单克隆“DNA簇群”。“DNA簇群”在Genome Analyzer 综合分析仪上进行序列分析 。

（参考http://www.emtd.com.cn/product/Solexa1.htm）



采用“可逆性末端终止反应”进行序列分析

图片来源：*Katie Ris-Vicari*

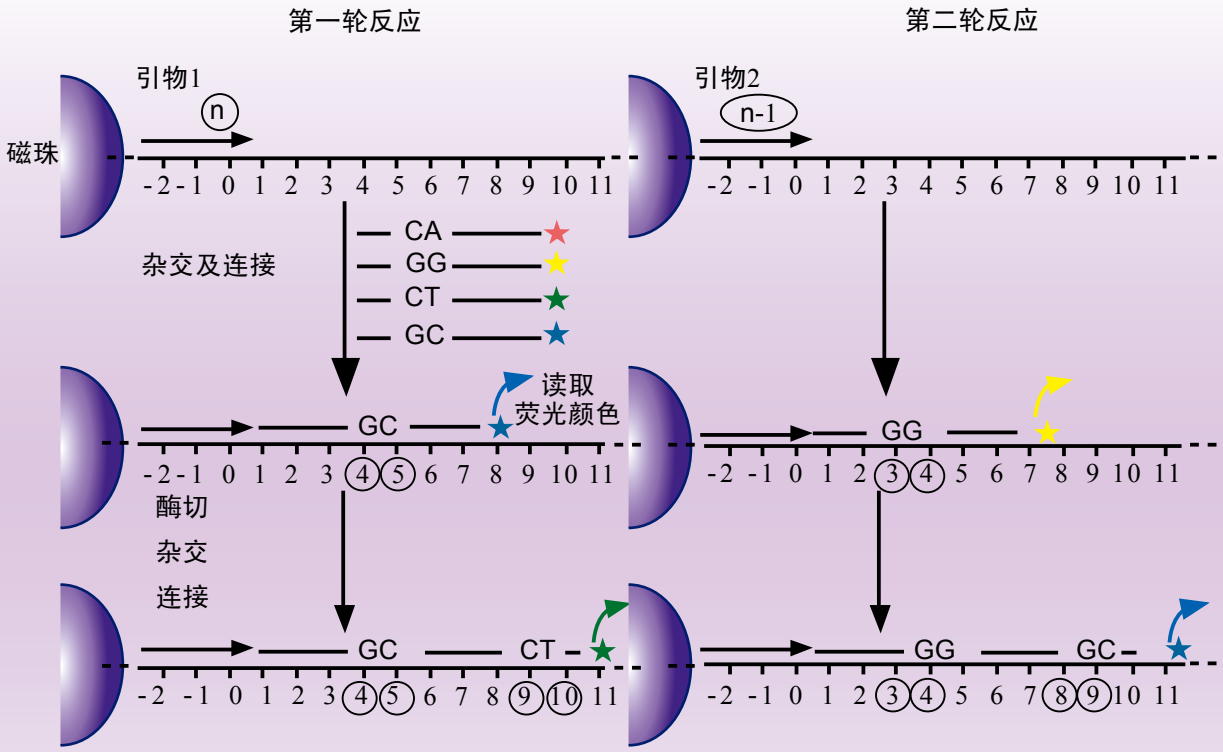
序列合成反应体系包括有引物、DNA聚合酶、4种标记了不同荧光的核苷酸，每个核苷酸的碱基被保护基团封闭。每次反应掺入一个核苷酸，该核苷酸类别可通过标记荧光进行识别，经过扫描，读取该次反应颜色后，位于碱基3'末端的保护基团被除去，继续下一轮反应，如此反复，得出片段的精确序列。该技术读长为30–35个核苷酸。

SOLiD技术

DNA经物理方法处理成几百碱基左右的片段，两端与接头相连接，与接头相连的DNA片段和固定有与接头序列互补序列的磁珠混合后，进行乳滴PCR。PCR扩增结束后，将变性DNA单链与Beads移至载玻片上。

连接法测序

测序引物与接头可以互补杂交，其5'端可与和邻近序列互补的寡核苷酸相连。八聚体寡核苷酸可竞争性与引物相连接（该寡聚体的第四位和第五位为荧光标记位点）。当其标记颜色被读取后，即将连接上的寡核苷酸在第五位和第六位之间切断，以移除标记，进行下一轮反应，以此依次循环。在第一轮反应中，可以得到确定的碱基位点为：4、5、9、10、14、15位碱基等。重复该反应过程，偏移一位碱基，使用较第一轮少一个碱基的引物进行反应，可以确定的碱基位点包括：3、4、8、9、13、14等，如此往复，直至偏移至引物的第一个碱基（即待测序列0位点碱基）。由于该位点碱基已知，可通过读取的荧光颜色得知位点1的碱基类型，然后，又以位点1碱基荧光颜色推知位点2的碱基类型，依此类推，直至整个序列读序完成。此技术目前的读长为30至35个碱基。



连接法测序示意图

图片来源：*Katie Ris-Vicari*

原文检索：Nature Methods - 5, 15 （2008）
Published online: 19 December 2007; | doi:10.1038/nmeth1155

扩展阅读：
http://bio.biox.cn/protocols/200706/20070625234254_26254.shtml

筱玥 编译