

DNS sekvenēšanas metodes



Ivars Silamiķelis

Kas ir DNS sekvenēšana?

- DNS ir slāpekļa bāzu (nukleotīdu) polimērs
- DNS molekulas nukleotīdu secības noteikšana



Vēsture



The Nobel Prize in Chemistry 1980

14 October 1980

The Royal Swedish Academy of Sciences has decided to award the 1980 Nobel Prize in chemistry

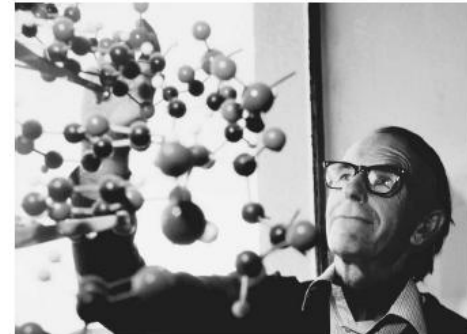
by one half to
Professor **Paul Berg**, Stanford University, USA,

for his fundamental studies of the biochemistry of nucleic acids, with particular regard to recombinant-DNA,

and the other half jointly to
Professor **Walter Gilbert**, Harvard University, USA,

and Professor **Frederick Sanger**, Cambridge University, Great Britain,

for their contributions concerning the determination of base sequences in nucleic acids.



Frederick
Sanger



Walter Gilbert

Pirmās paaudzes sekvenēšanas metodes

Viens paraugs vienā reakcijā

Ķīmiskās degradācijas sekvenēšanas metode

Ķīmiskās degradācijas metodes pamatā ir 5' galā iezīmēta DNS fragmenta ķīmiska bāzes specifiska šķelšanas reakcija.

Sekvences garums – 200 – 300b (max 500b)

Kvalitāte >99%

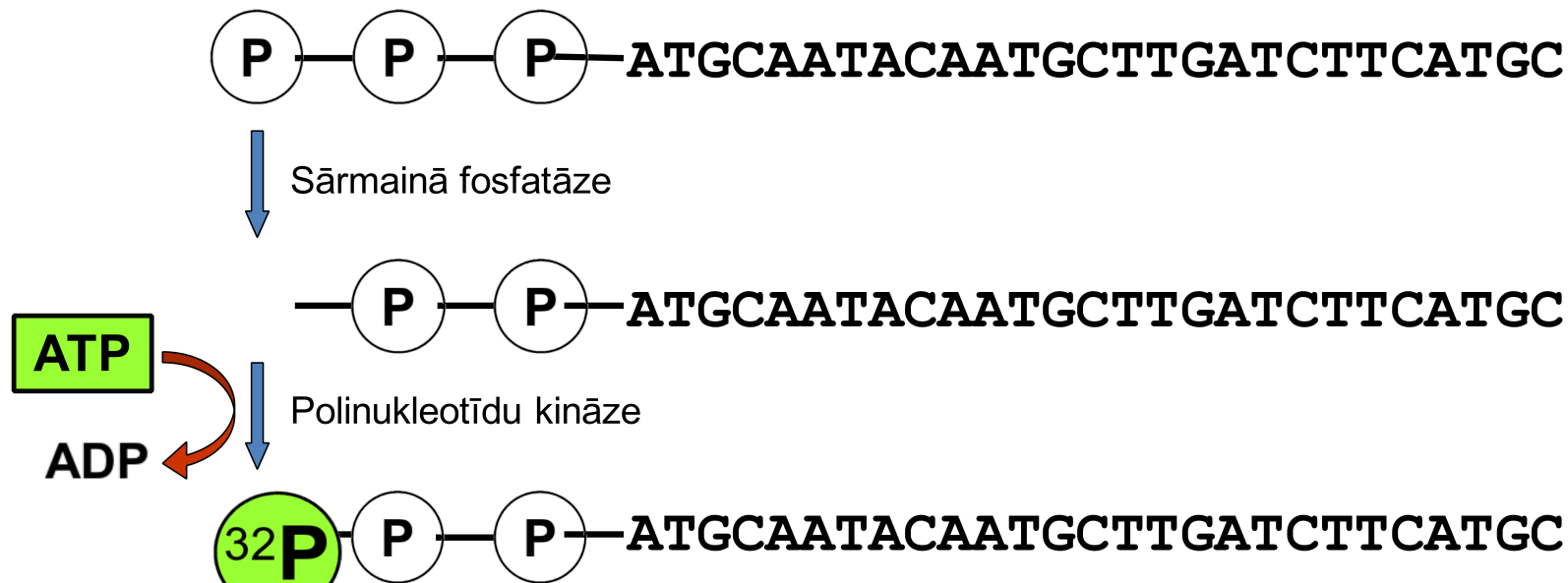
Izmanto elektroforēzi.

Ķīmiskās degradācijas sekvenēšanas metode

1. Fragmenta iezīmēšana

A- Sārmainā fosfatāze atšķeļ 5' gala fosfātu

B- Polinukleotīdu kināze pievieno iezīmētu fosfātu 5' galā
(par substrātu izmantojot iezīmētu ATP)



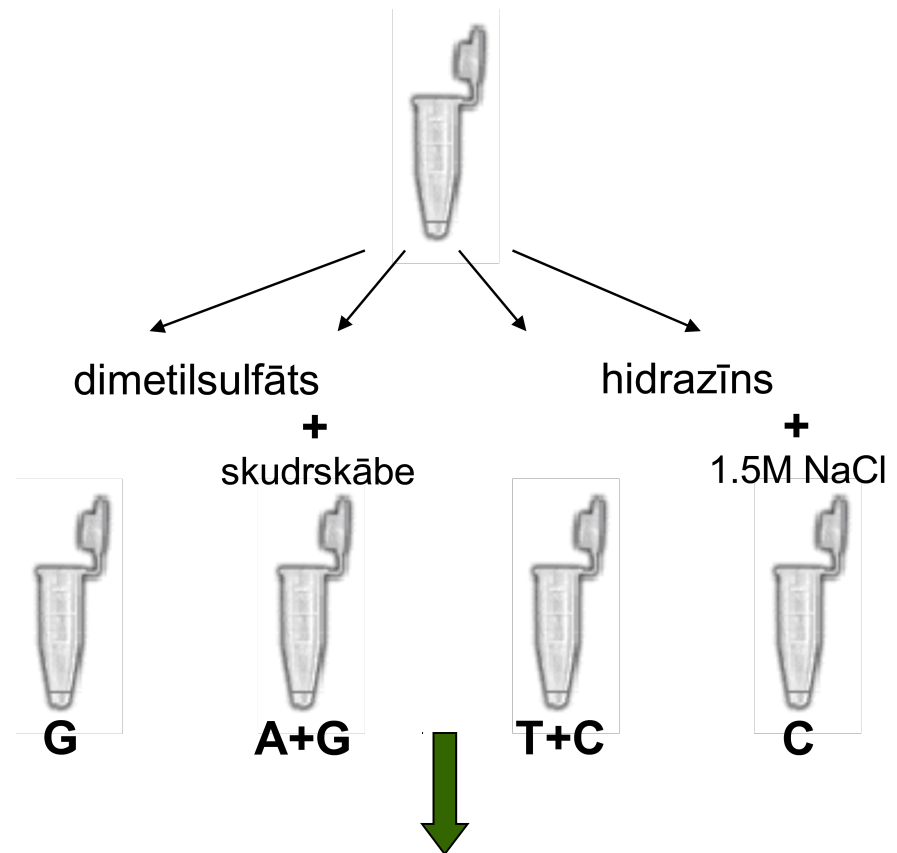
Ķīmiskās degradācijas sekvenēšanas metode

2. Bāzu iezīmēšana

Paraugs tiek sadalīts 4 daļās un tiek veikta:

- Purīna bāzu metilēšana
(dimetilsulfāts)

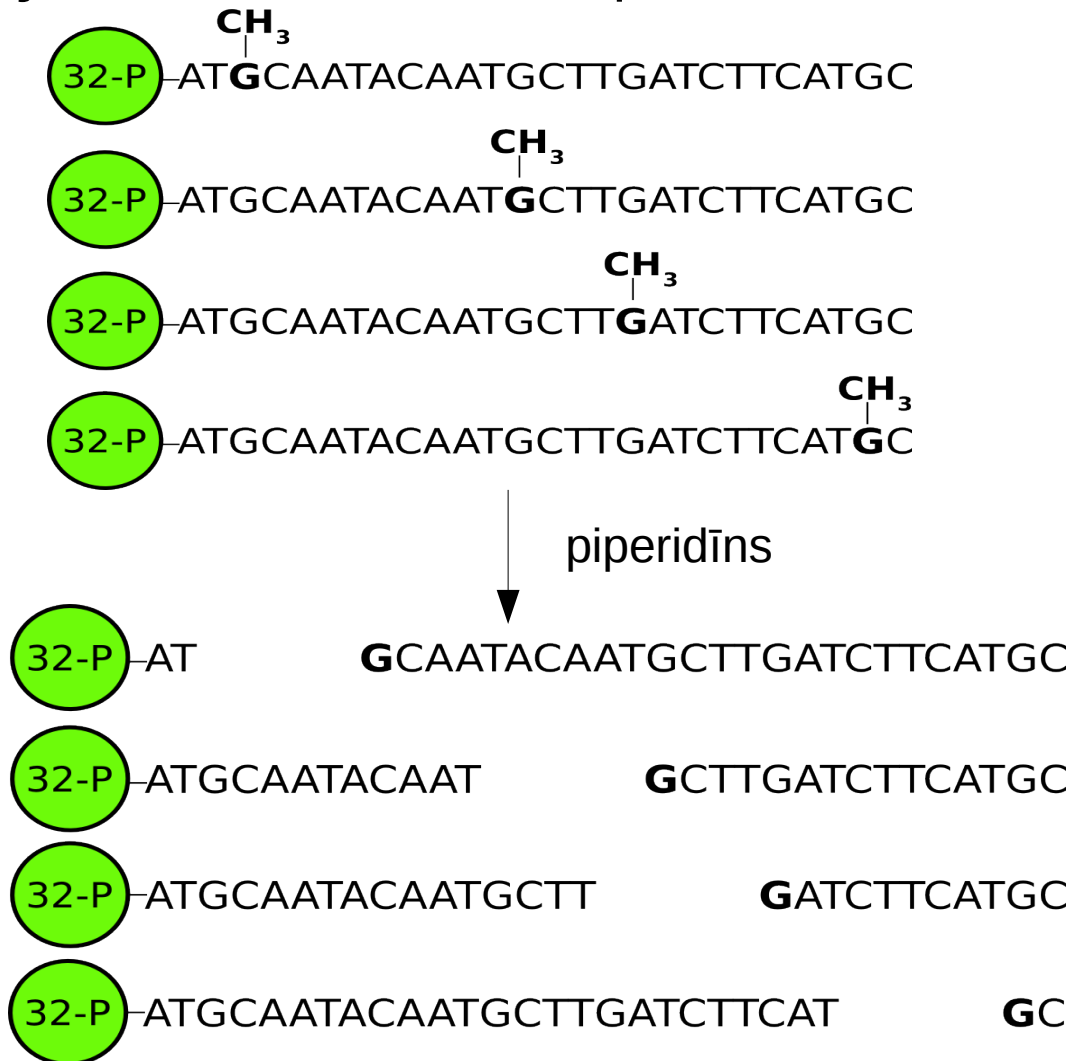
- Pirimidīna bāzu šķelšana
(hidrazīns)



Kīmiskās degradācijas metode

3.DNS fragmenta šķelšana

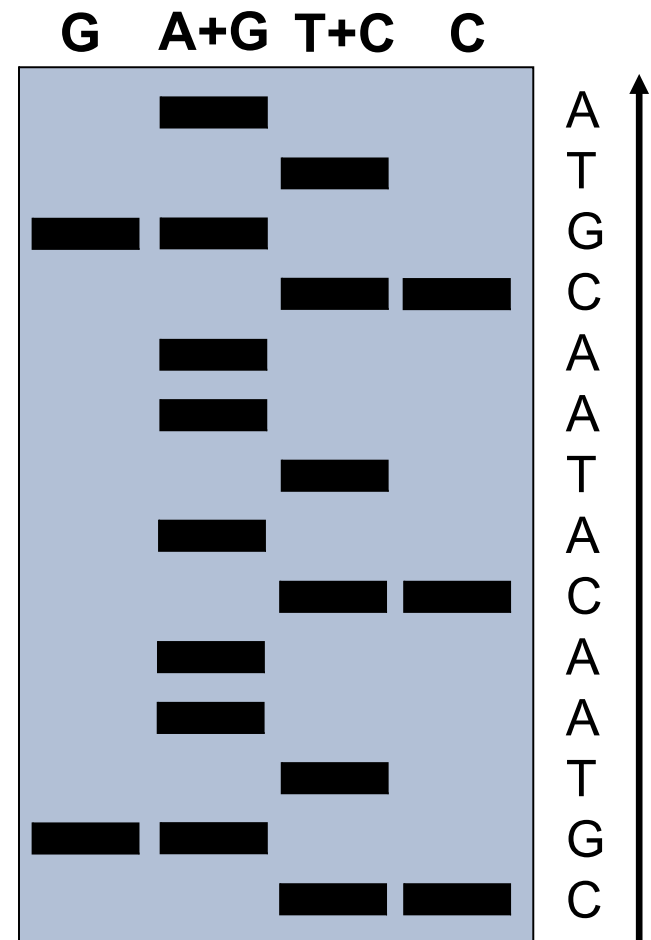
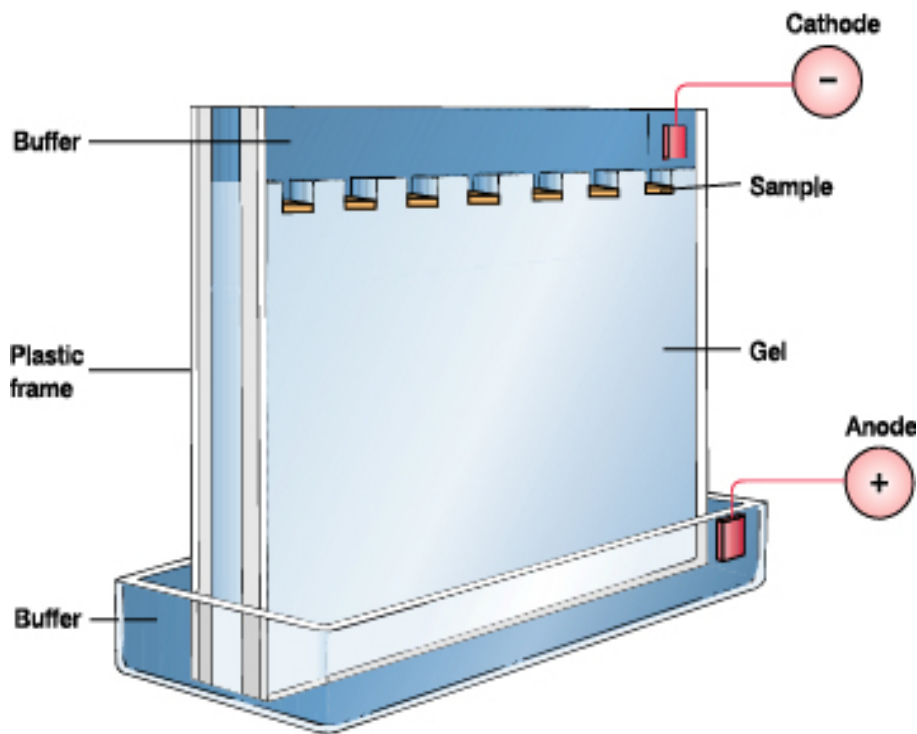
Piperidīns šķel fosfordiestersaiti tieši pirms modificētā nukleotīda.



Kīmiskās degradācijas metode

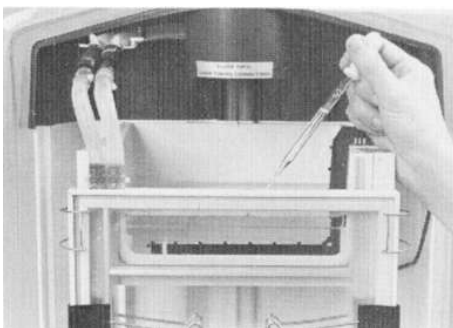
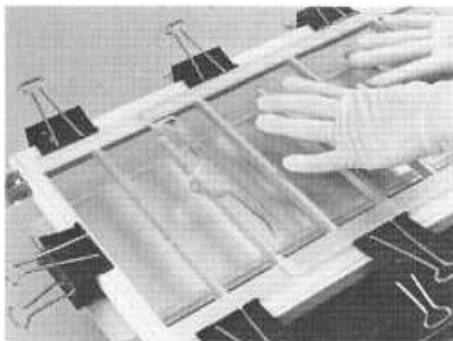
4. Poliakrilamīda gēla elektroforēze

(6%, 1x TBE (Tris-borate-EDTA) +denaturējošs)



Ķīmiskās degradācijas metode

4. Poliakrilamīda gēla elektroforēze

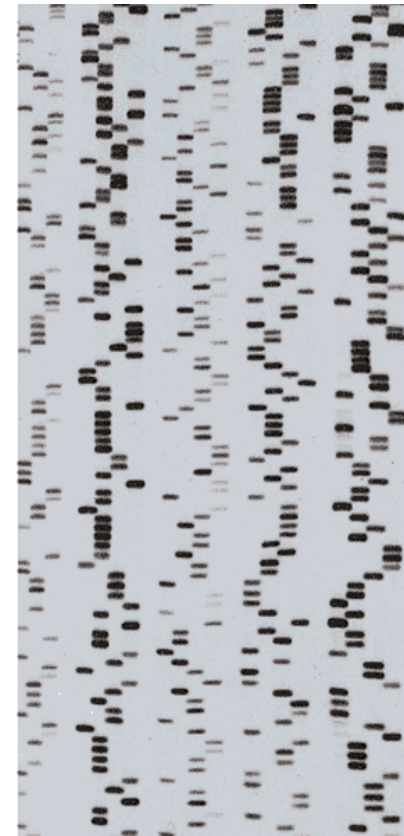
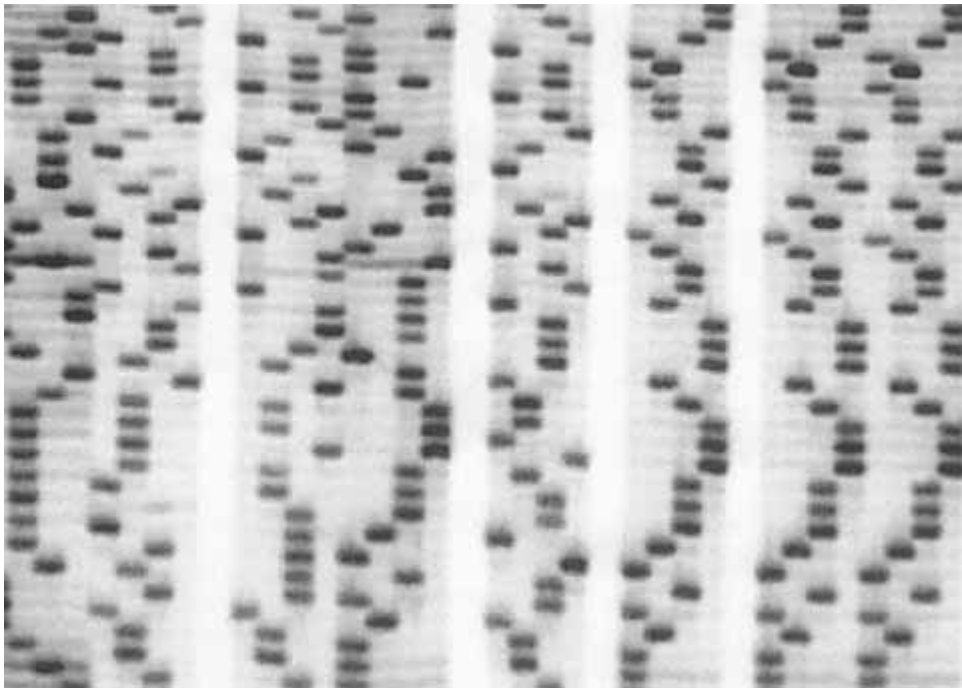


LKB 2010 *Macrophor* sekvenēšanas sistēma

Ķīmiskās degradācijas metode

5. Vizualizācija

Gēls tiek eksponēts uz rentgenstaru filmas 24-36h.



Ķīmiskās degradācijas metode

Mīnusi

- Vajadzīgs liels DNS daudzums;
- Samērā īsi nolasījumi 200-300bp;
- Ļoti laikietilpīgs un darbietilpīgs process;
- Metode nav automatizējama;
- Darbs ar veselībai bīstamām vielām.

Plusi

- Var sekvenēt rajonus ar izteiktu otrējo struktūru;
- Var sekvenēt oligonukleotīdus;
- Var izmantot, lai noteiktu proteīnu saistīšanās rajonus (*DNS footprinting*).

Sangera sekvenēšanas metode

Sangera metodes pamatā ir DNS ķēdes sintēzes terminācija, izmantojot modificētus nukleotīdus.

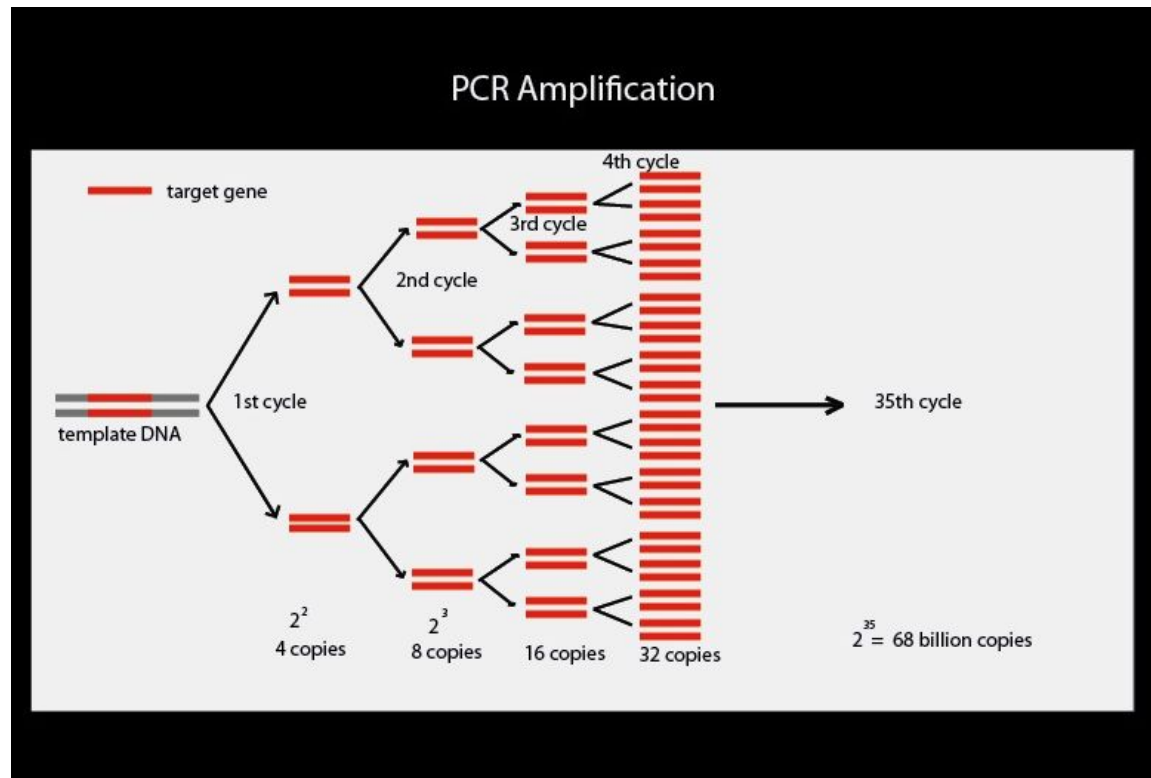
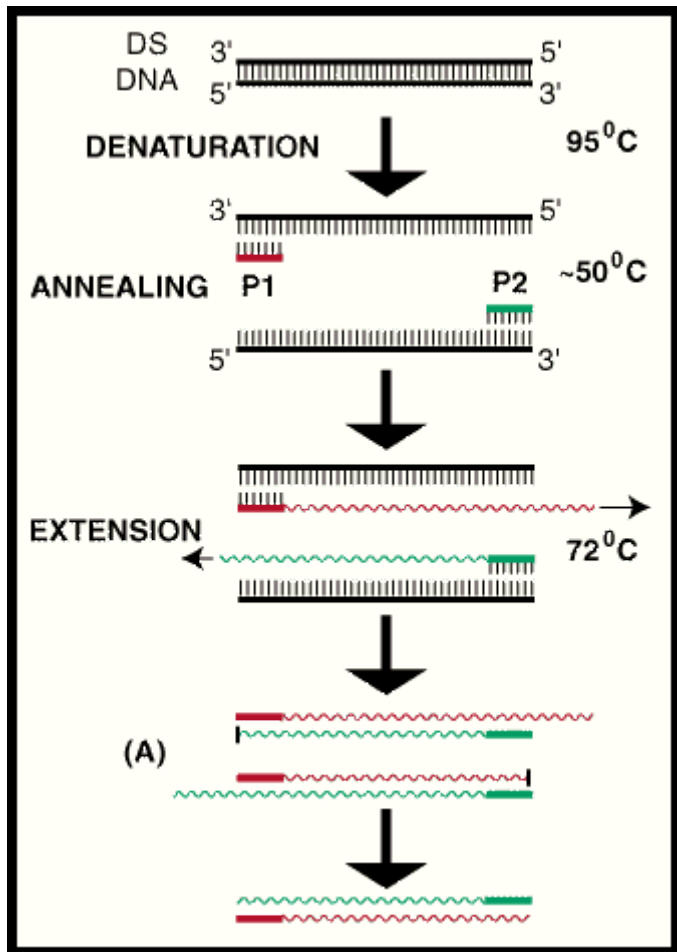
Sekvences garums – 750-1000bp

Kvalitāte - >99%

Šobrīd visplašāk lietotā metode.

Izmanto elektroforēzi.

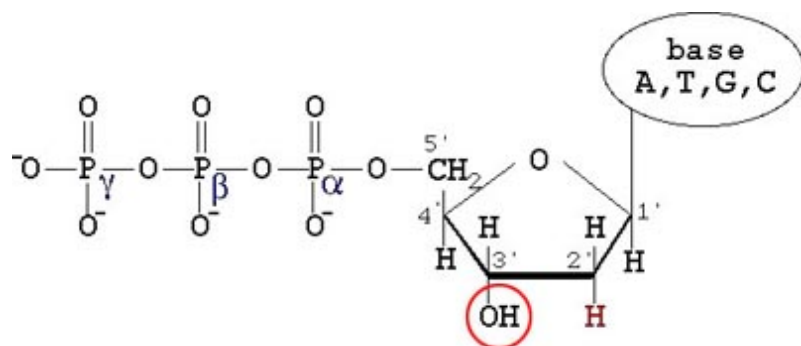
Polimerāzes ķēdes reakcija (PCR)



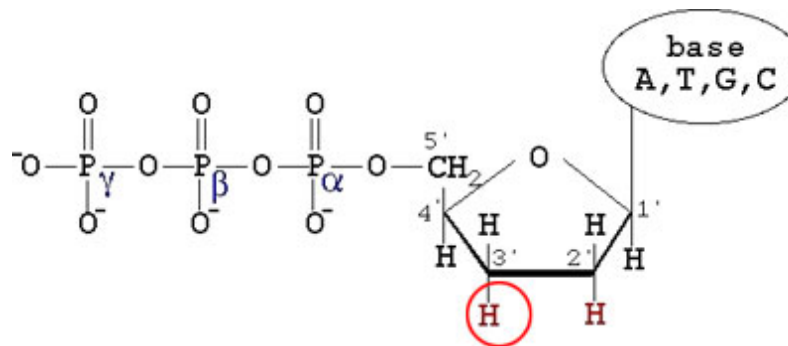
Sangera sekvenēšanas metode

1.PCR daļa

Didezoksinukleotīdam nevar pievienot nākamo nukleotīdu, jo nukleotīda 3' pozīcijā **trūkst OH grupa**. DNS ķēdes sintēze tiek pārtraukta.



dNTP
deoxyribonucleotide triphosphate



ddNTP
dideoxynucleotide triphosphate

Sangera sekvenēšanas metode

1.PCR daļa

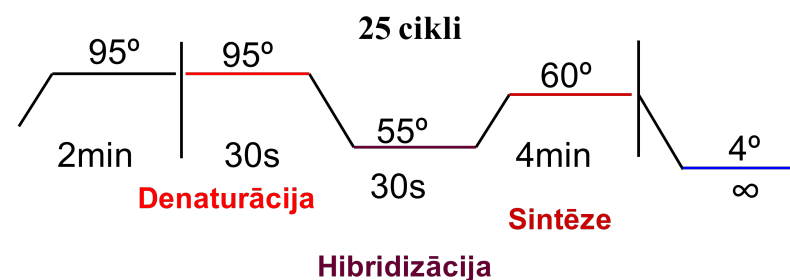
Reakcijas maisījums:

Buferšķīdums

BigDye → dNTP; ddNTP** ; **viens** praimeris

Polimerāze

DNS - attīrīta



Polimerāze - **bez eksonukleāzes** aktivitātes;

- **ar augstu toleranci** pret modificētiem nukleotīdiem.

Piemēram: Klenova fragments

Modificēta T7 bakteriofāga DNS polimerāze (sekvenāze)

Šobrīd – modificētas *Taq* polimerāzes formas

Sangera metode

1.PCR daļa

PCR rezultātā tiek iegūti dažāda garuma produkti, kas ir radioaktīvi vai fluorescenti iezīmēti

5' -TACG...GTTAC GAACTAGAAGTACCG-3'

5' -ATGC...CAATG C -3'

5' -ATGC...CAATG CTTG -3'

5' -ATGC...CAATG CTTGATC -3'

5' -ATGC...CAATG CTTGATCTTCATG -3'

5' -ATGC...CAATG CTTGATCTTCATGG -3'

5' -ATGC...CAATG CTTGATCTTC -3'

5' -ATGC...CAATG CTTGATCTTCATGGC -3'

5' -ATGC...CAATG CT -3'

5' -ATGC...CAATG CTTGA -3'

5' -ATGC...CAATG CTT -3'

5' -ATGC...CAATG CTTGATCTTCA -3'

5' -ATGC...CAATG CTTGAT -3'

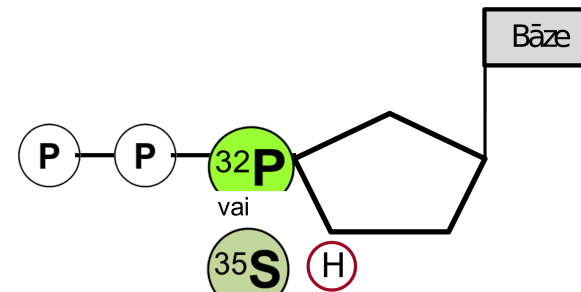
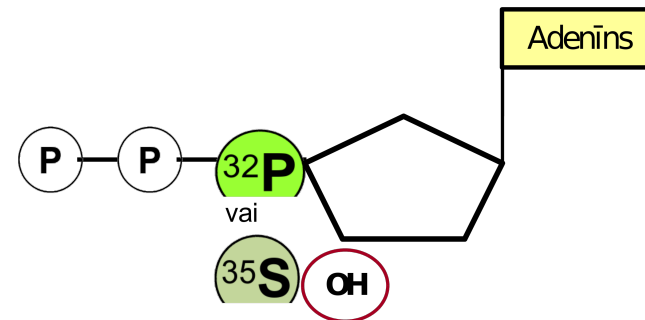
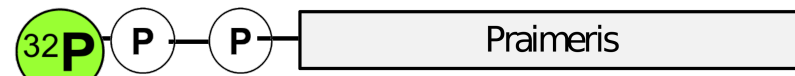
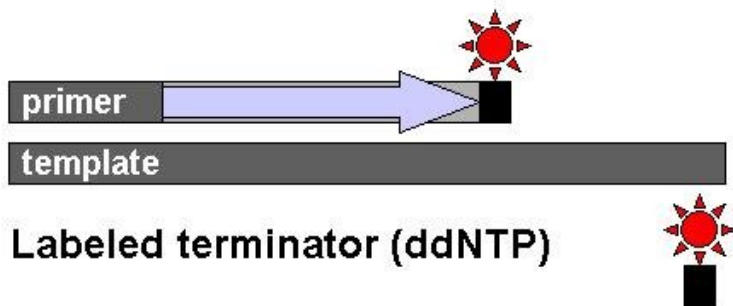
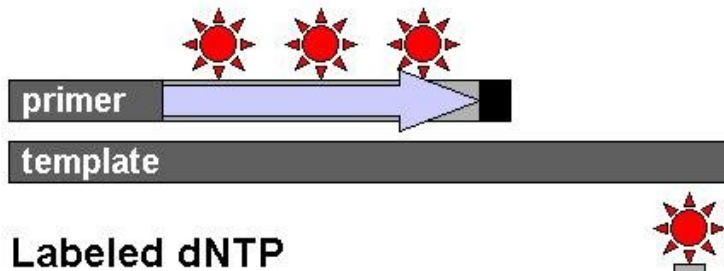
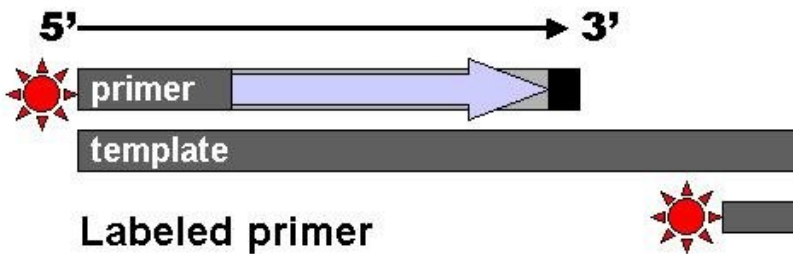
5' -ATGC...CAATG CTTGATCT -3'

5' -ATGC...CAATG CTTGATCTT -3'

5' -ATGC...CAATG CTTGATCTTCAT -3'

Sangera metode

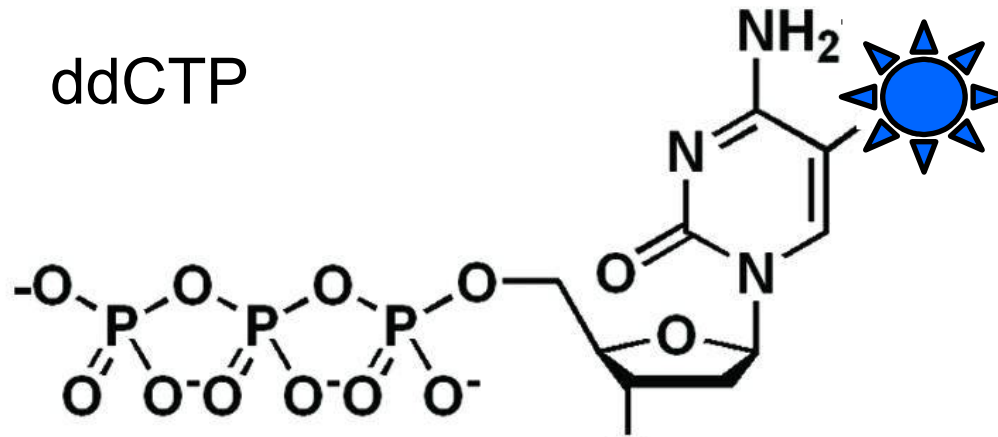
Fragmentu iezīmēšana - radioaktīva



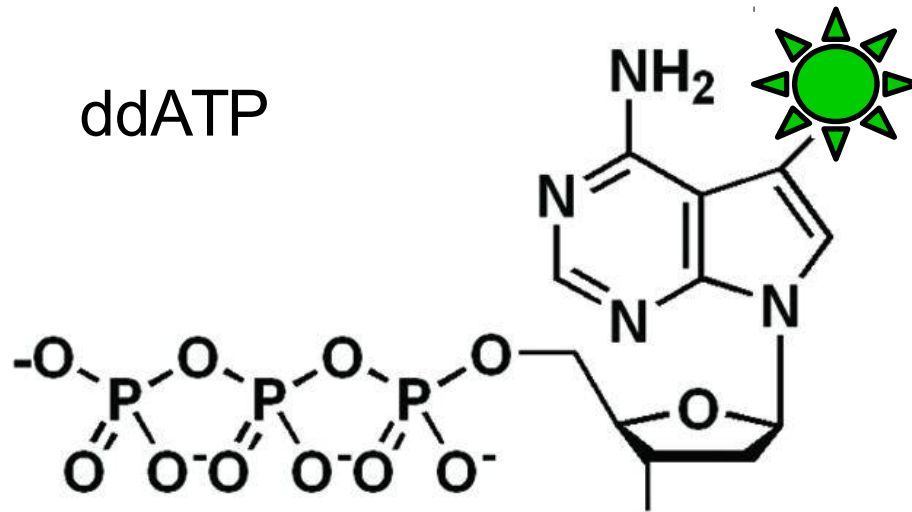
Sangera metode

Fragmentu iezīmēšana - fluorescēta

ddCTP



ddATP



Sangera metode

2. PCR produkta attīrīšana un denaturācija.

PCR produkts tiek attīrīts - lai atbrīvotos no piemaisījumiem: liekajiem nukleotīdiem un sāļiem.

Attīrīt var: izgulsnējot ar etanolu un amonija acetātu, attīrot ar sefadeksu.

PCR dsDNS tiek denaturēta, lai atbrīvotos no garajiem matricas DNS fragmentiem.

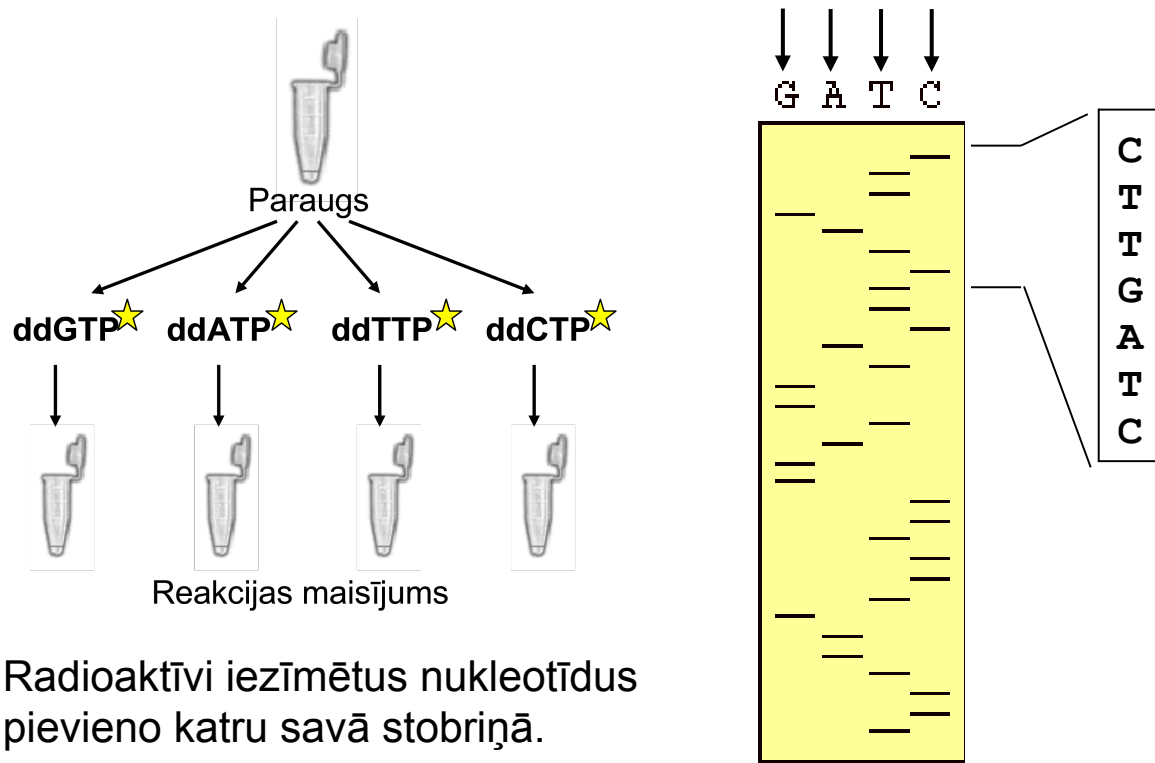
To panāk: karsējot un pievienojot denaturējošu reaģentu (formamīdu).

Sangera metode

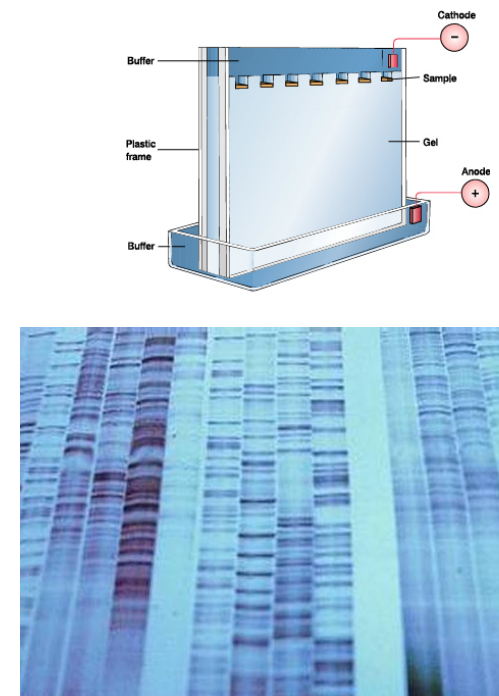
3. Sekvenēšana

PCR produktu nes uz akrilamīda gēla un veic elektroforēzi.

A – nukleotīdi ir iezīmēti ar radioktīvu iezīmi.



Radioaktīvi iezīmētus nukleotīdus pievieno katru savā stobriņā.

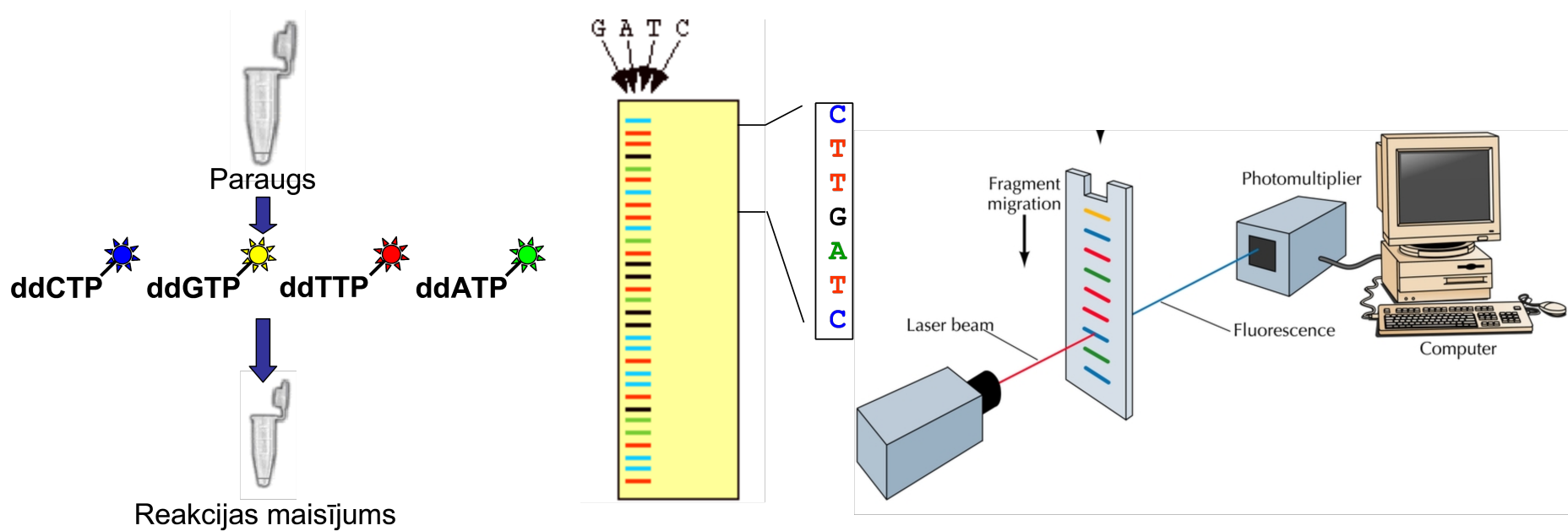


Sangera metode

3. Sekvenēšana

PCR produktu nes uz akrilamīda gēla un veic elektroforēzi.

B – nukleotīdi ir iezīmēti ar fluorescentu iezīmi.



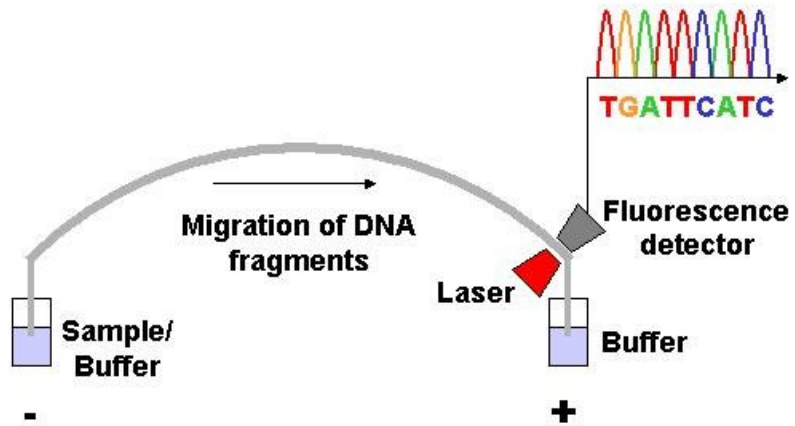
Fluorescently labeled nucleotides are added to a single lane.

Laser reads the fluorescent signal of the nucleotides.

Sangera metode

3. Sekvenēšana

Kapilārā elektroforēze



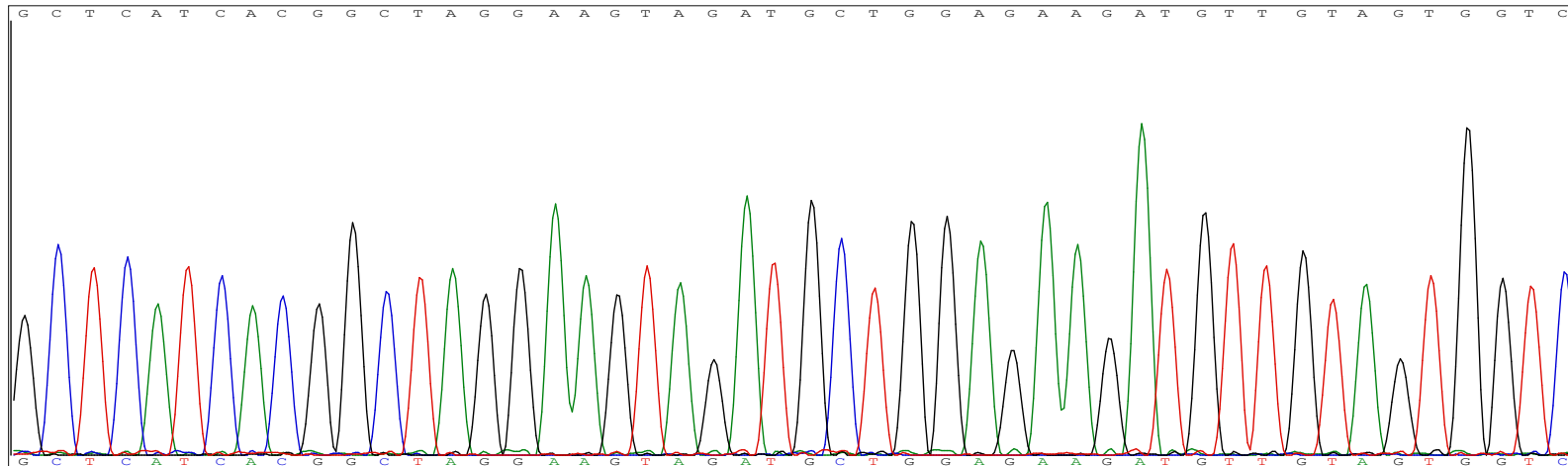
Fluorescentu iezīmētu DNS fragmentu virzība kapilārā.



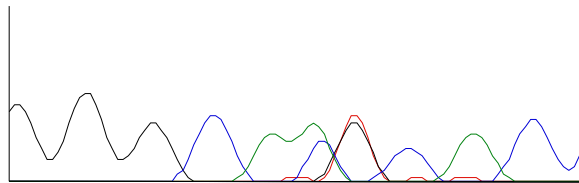
Sekvenators ABI 3100

Sangera metode

Rezultāti, kas tiek iegūti pēc fluorescento nukleotīdu nolasīšanas.

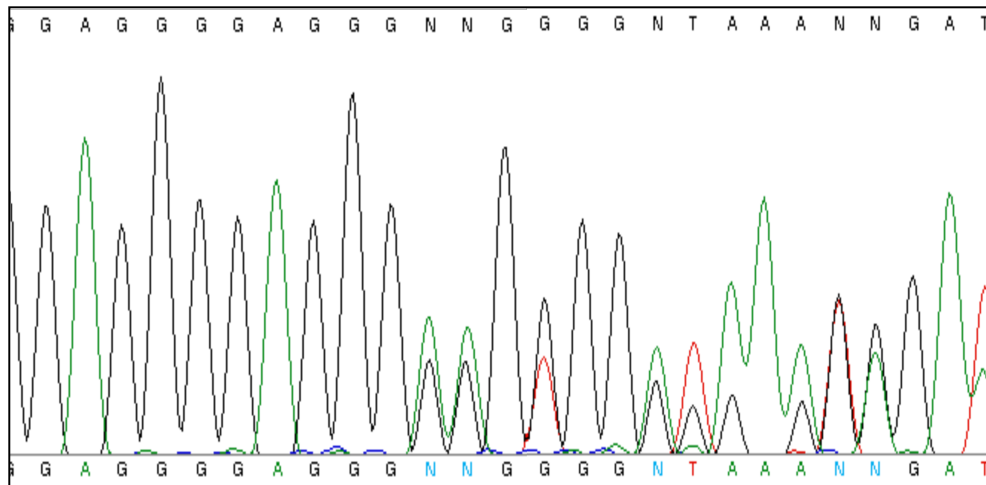


G G G C A N C A C



G G G C A N C A C

Sekvenčē ir atpazīstami SNP
(viena nukleotīda nomaiņa).

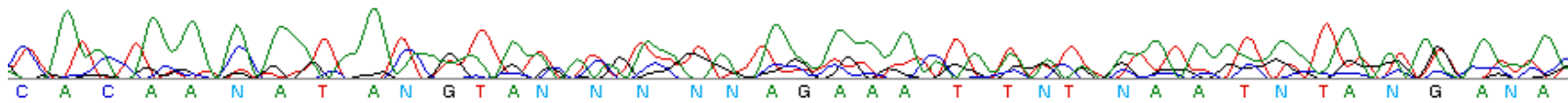


Sekvenčē ir atpazīstama delēcija

Sanger metode

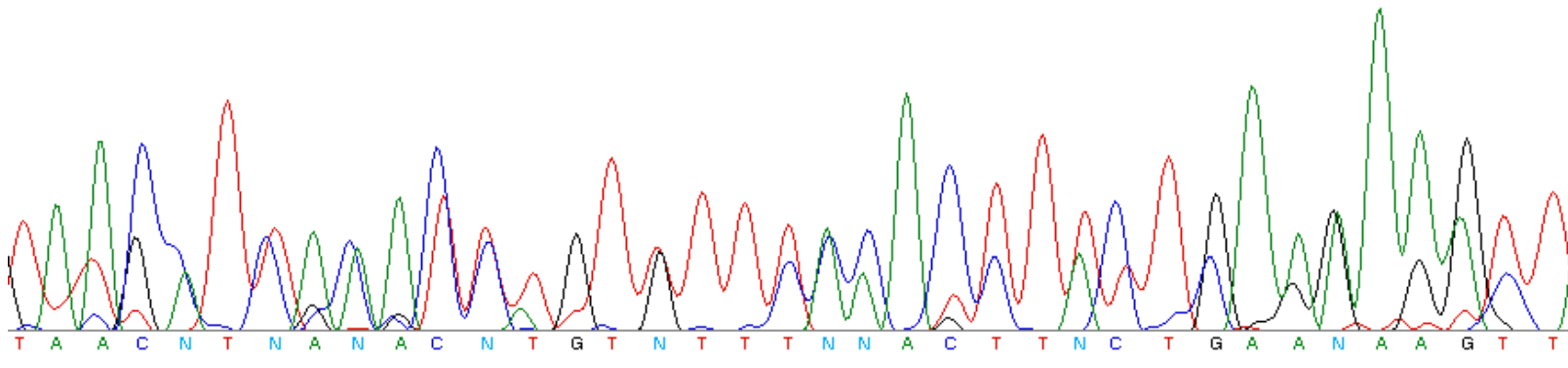
Paraugs, kas satur degradētu DNS.

C A C A A N A T A N G T A N N N N N A G A A A T T N T N A A T N T A N G A N A



Paraugs, kas satur piemaisījumus.

T A A C N T N A N A C N T G T N T T T N N A C T T N C T G A A N A A G T T



Otrās paaudzes sekvenēšanas metodes

Vairāki paraugi vienā reakcijā

Nepieciešama DNS amplifikācija, DNS bibliotēku veidošana

Pusvadītāja sekvenēšana (semiconductor)

Metodes pamatā – **pH mērīšana**

Sekvenēšanas apjomi – >1Gb 4,5 stundās

Sekvences garums – 200 bp

Kvalitāte – 98,5%

Pielietojums:

- Genoma sekvenēšana un pārsekvenēšana,
- Mērķa sekvenēšana (konkrētus rajonus)
- RNS sekvenēšana
- Kopiju skaita sekvenēšana
- Visa genoma vai eksoma sekvenēšana/ validēšana
- Bārkodu bibliotēkas (var uz viena čipa vairākus paraugus)
- *De novo* sekvenēšana.

IonTorrent sekvenatori



Proton
līdz 10 Gb



Personal Genome Machine
(PGM)
30 Mb – 2 Gb

Pielietojums

Mazi genomi

Gēnu kopas

Gēnu ekspresija

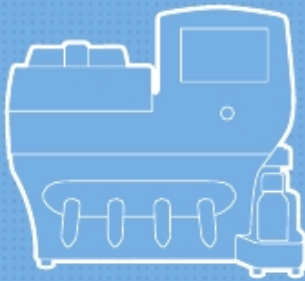
Transkriptoms

Cilvēka eksoms

Cilvēka genoms

Ion PGM™ Sequencer

314 316 318

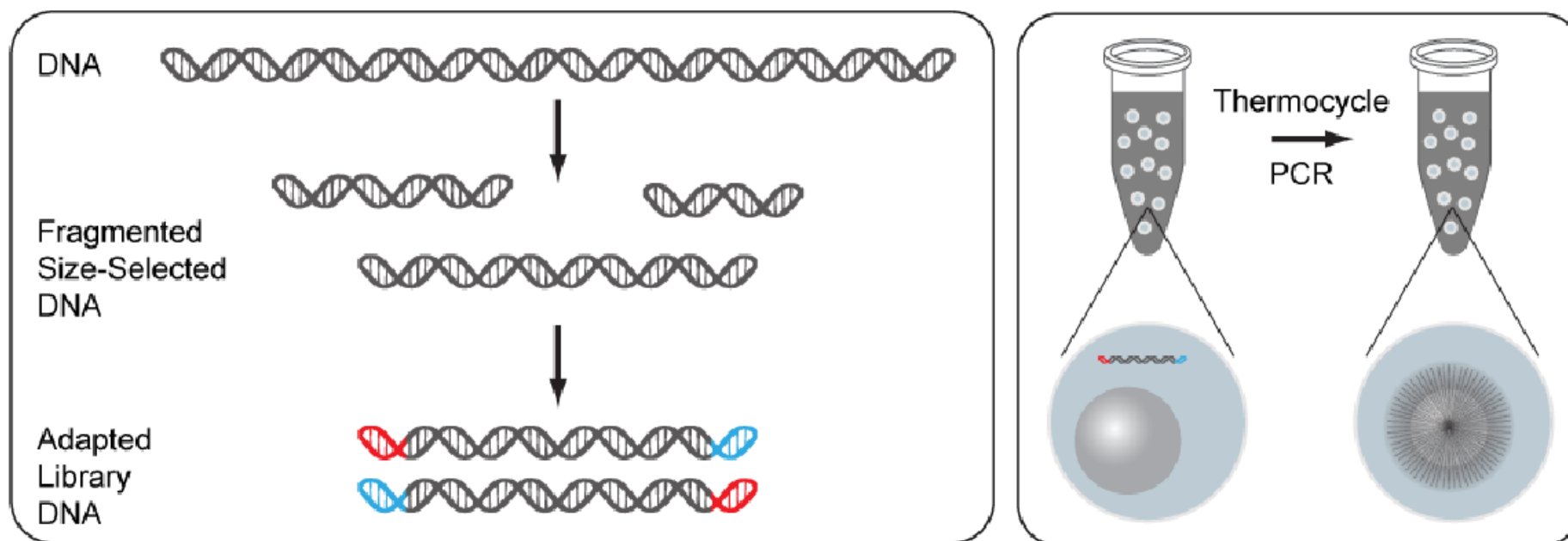


Ion Proton™ Sequencer

P1 P2

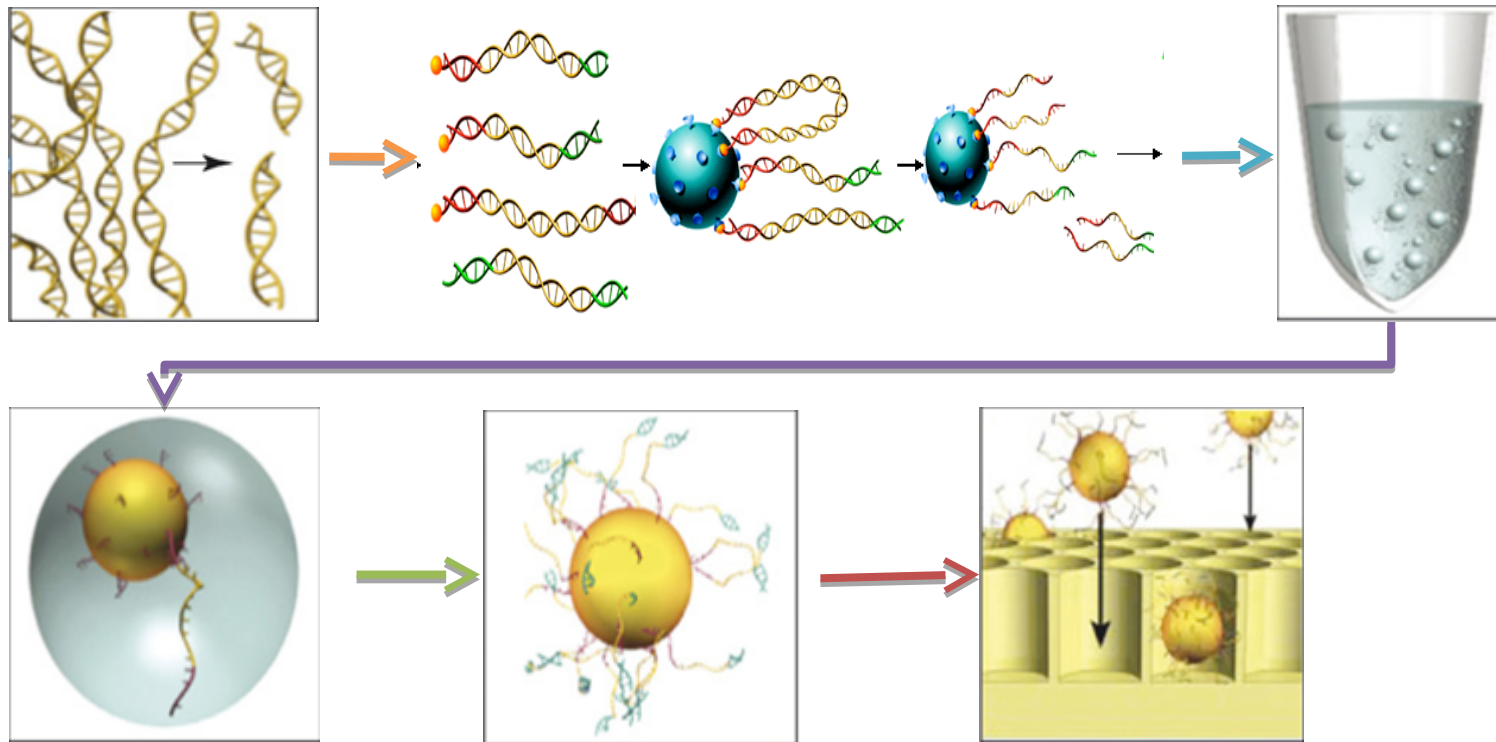


DNS Bibliotēku sagatavošana un emulsijas PCR

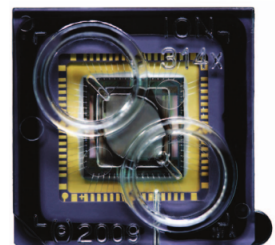


PCR reakcija noris eļļas un ūdens emulsijā, kur **ūdens pilienā atrodas visi vajadzīgie reaģenti**

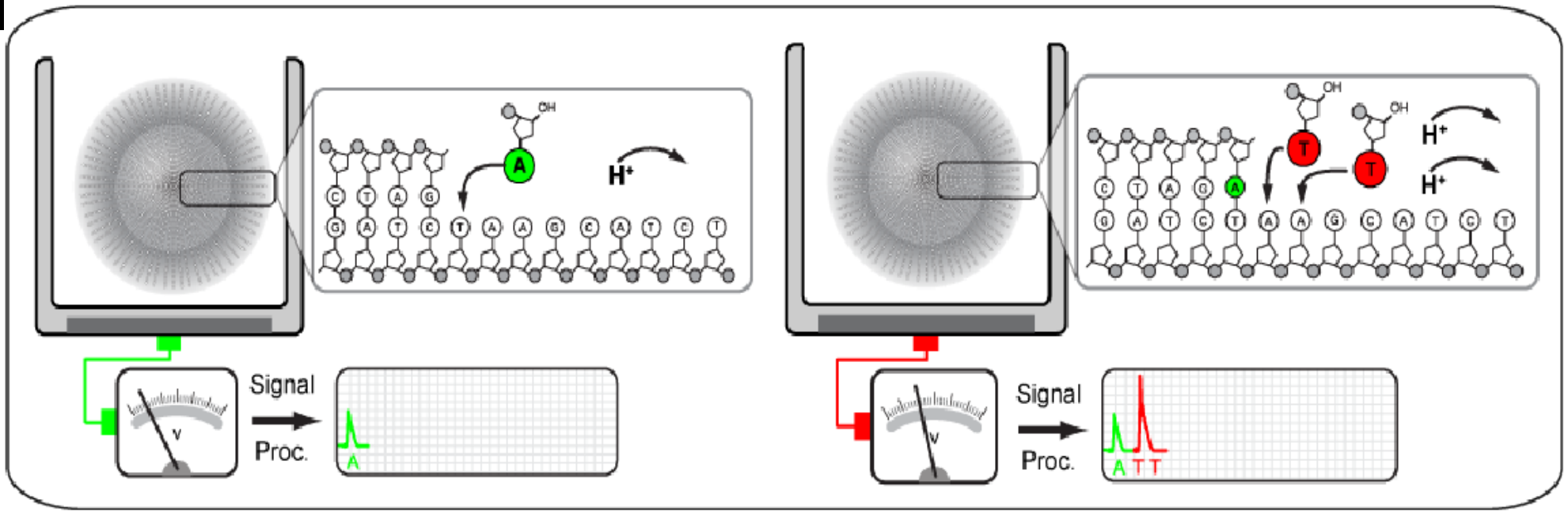
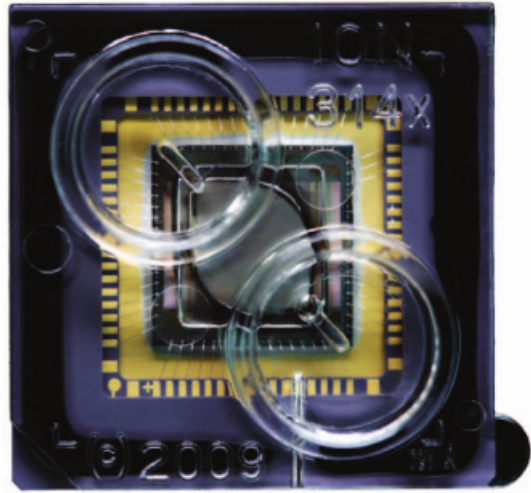
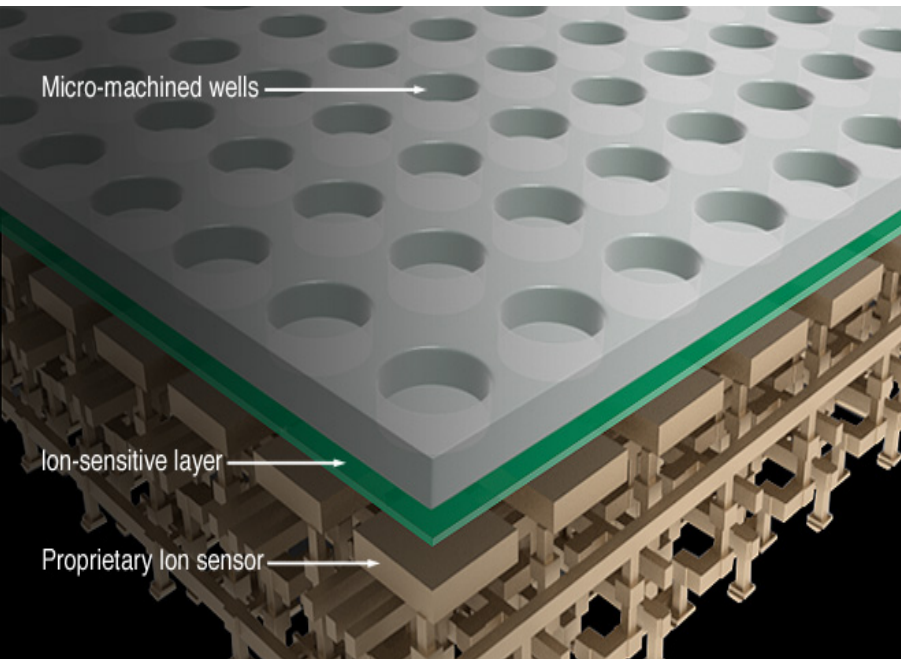
DNS bibliotēku sagatavošana un emulsijas PCR



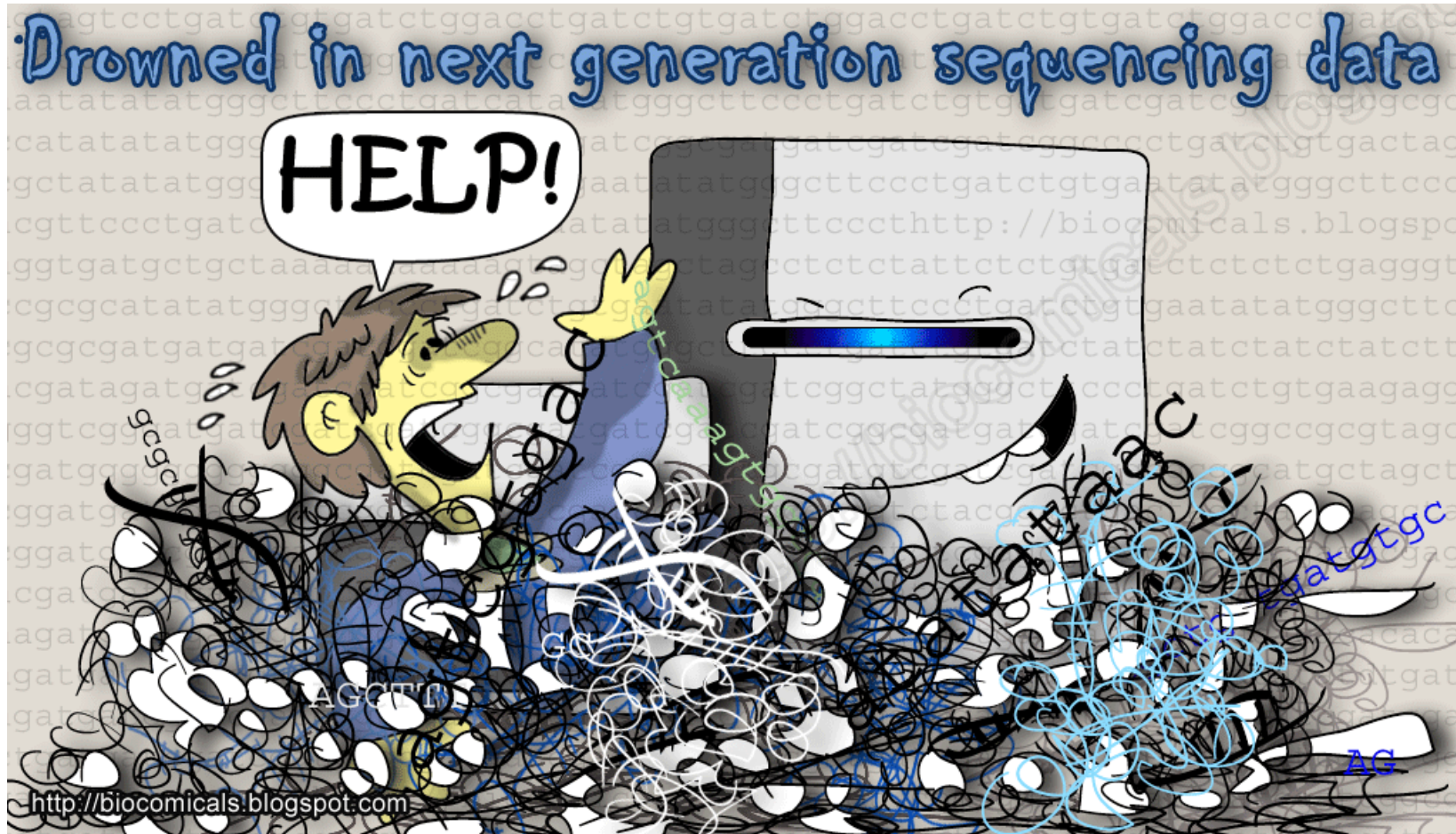
PCR reakcija noris eļļas un ūdens emulsijā, kur **ūdens pilienā atrodas visi vajadzīgie reaģenti**



IonTorrent sekvenēšana



Rezultāts



iegūst teksta failu(s) ar 400 000 – 80 miljoniem nolasījumu

454 sekvenēšanas tehnoloģija

454 sekvenēšanas tehnoloģija pamatojas uz pirosekvenēšanu.

Sekvenēšanas apjomi – 0,4 – 0,6 Gb 10-23h

Sekvences garums – līdz 1000 bp

Kvalitāte – 99.995%

Pielietojums:

De novo sekvenēšana,

Pārsekvenēšana,

Transkriptomu analīze,

Gēnu regulācijas pētījumi,

Metagenomiskos un paleogenomiskos pētījumos.

454 sekvenēšanas tehnoloģija

Ieskats pirosekvenēšanā:

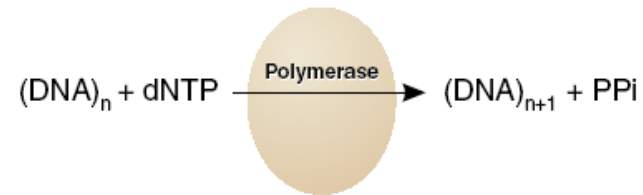
Metodes pamatā ir enzimatiska reakcija, kurā, komplementāra nukleotīda pievienošanas rezultātā, rodas gaismas signāls.

Papildus tiek izmantoti enzīmi:

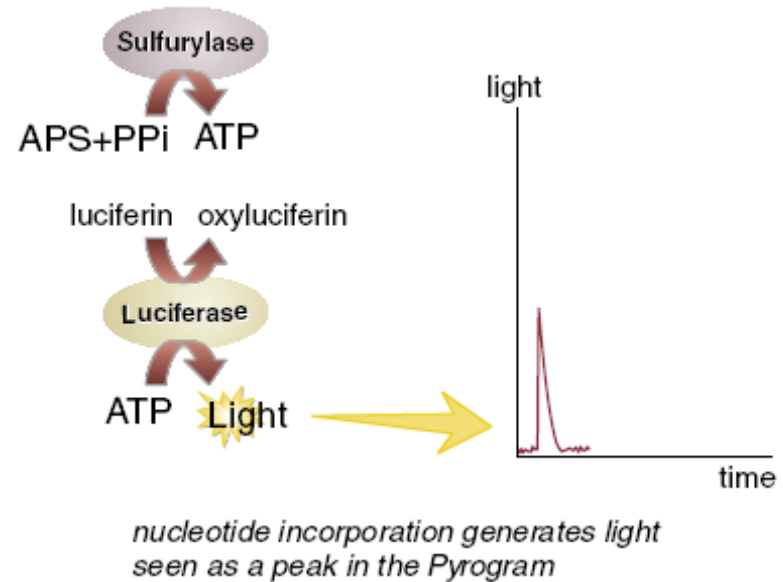
ATP sulfurilāze – substrāts adenoziņa fosfosulfāts (APS);
Luciferāze – substrāts luciferīns;
Apirāze – substrāti dezoksīnukleotīdi (dNTP - dATP, dTTP, dCTP, dGTP).

454 sekvenēšanas tehnoloģija

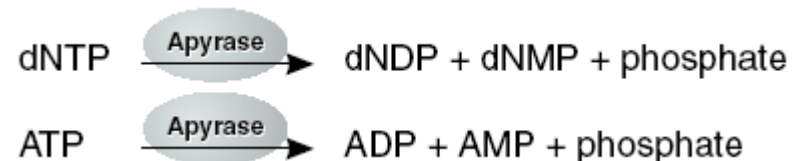
1. Polimerāze inkorporē nukleotīdu



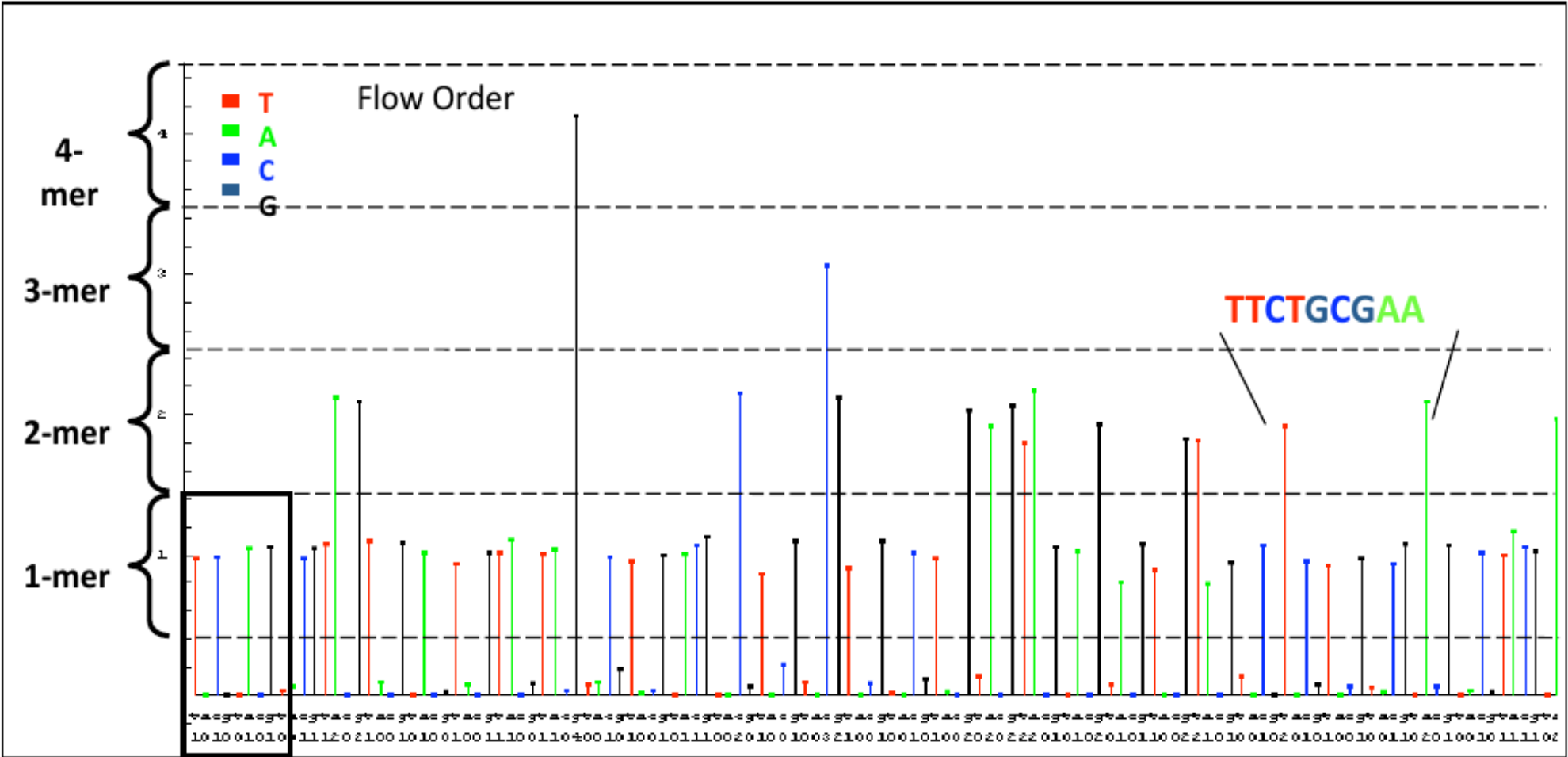
2. Tiek ģenerēts gaismas signāls



3. Atlikušie nukleotīdi tiek degradēti



454 sekvenēšanas tehnoloģija

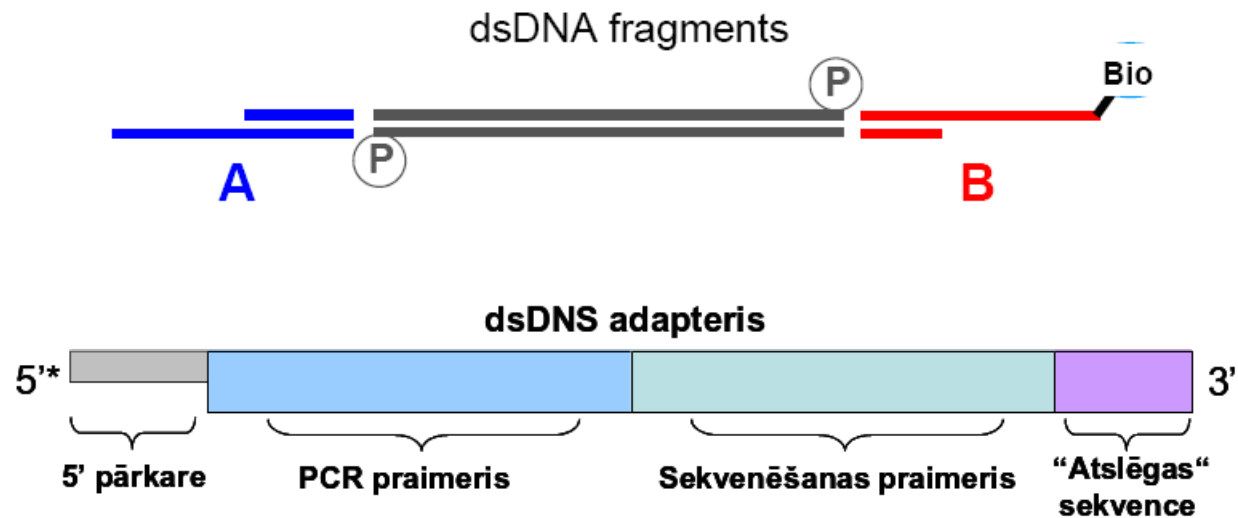


Key sequence = TCAG for signal calibration

454 sekvenēšanas tehnoloģija

A – Paraugu bibliotēkas sagatavošana

1. DNS tiek sašķelta līdz 300-800bp gariem fragmentiem.
2. ssDNS 3' un 5' galos tiek ligēti īsi adapteri (oligonukleotīdi) A un attiecīgi B.
Adapteri tiek izmantoti fragmentu:
 - Attīrīšanā
 - Amplifikācijā
 - Sekvenēšanā

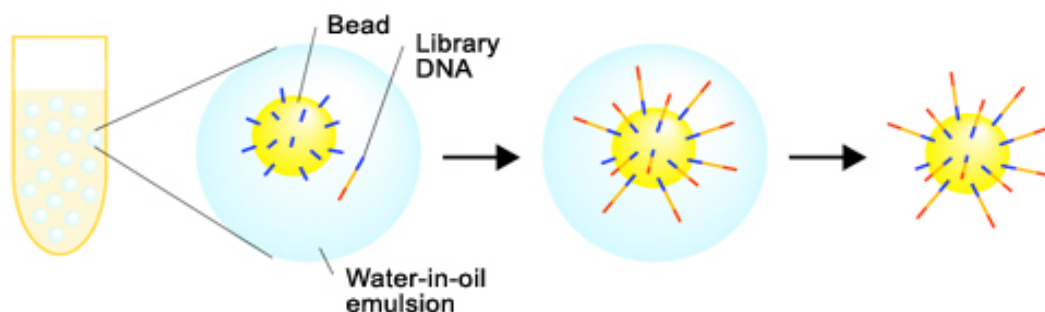


*5' B adapterim ir piesaistīts biotīns.

454 sekvenēšanas tehnoloģija

A – Paraugu bibliotēkas sagatavošana

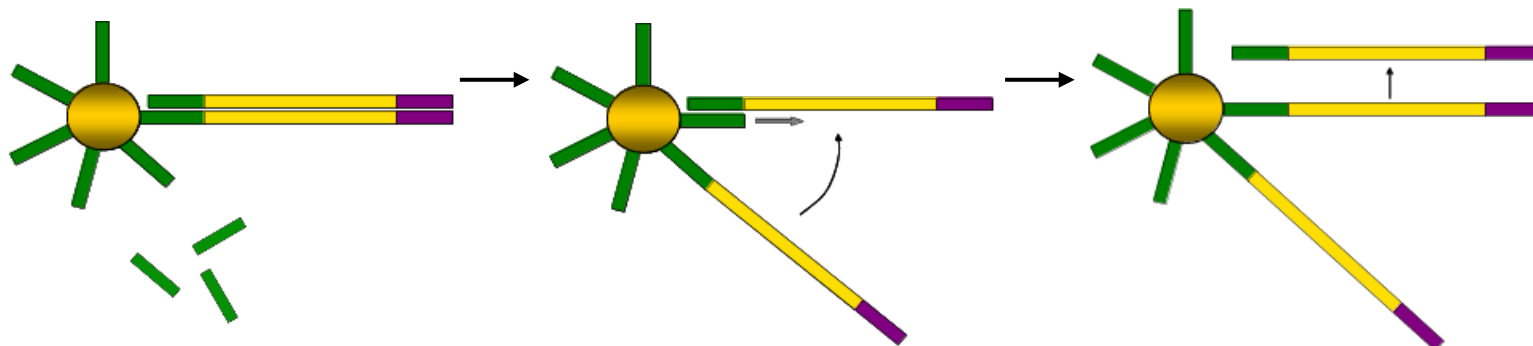
4. Emulsijas PCR. Tiek sajaukta emulsija: lodītes ar DNS, amplifikācijas reaģenti, ūdens un eļļa. Veidojas mikroreaktori, kas satur visus reaģentus un tikai vienu lodīti.



1) Nepiesaistītā ķēde disociē.

2) Jaunās ķēdes sintēze.

3) Matricas DNS fragments disociē....



5. Pēc emPCR emulsija tiek izjaukta, lodītes attīrītas un atdalītas tukšās, DNS fragmentu nesaturošās, lodītes.

454 sekvenēšanas tehnoloģija

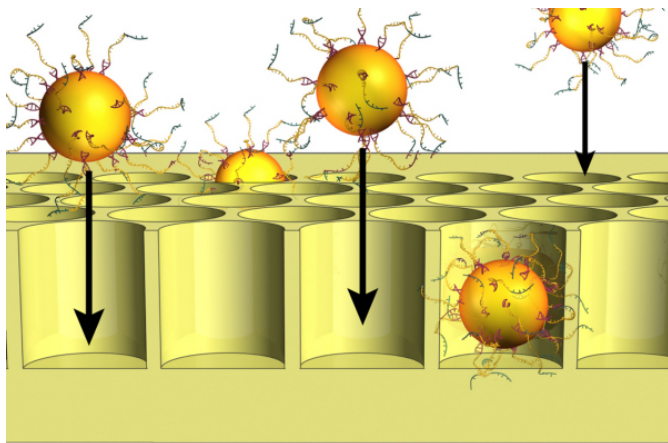
B - Sekvenēšana:

5. DNS nesošo lodīšu maisījumam pievieno sekvenēšanas praimeru un prameris hibridizējas pie adaptera.

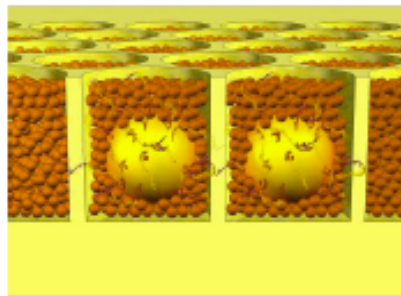
6. Lodītes tiek vienmērīgi sajauktas ar lodīšu inkubācijas maisījumu, kas satur DNS polimerāzi.

Maisījums tiek uzņemts uz optiskās šķiedras plates.

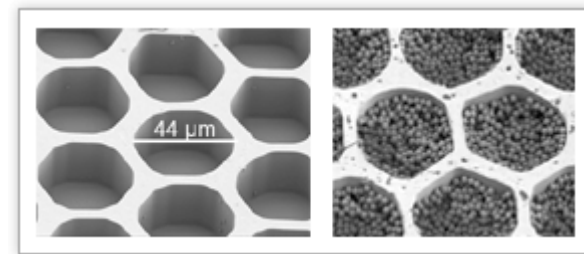
Tiek pievienotas "enzīmu" lodītes, kas satur sulfūrilāzi un luciferāzi.



Vienā bedrītē ir viena DNS lodīte



DNS lodītes pārklātas ar "enzīmu" lodītēm



Plates bedrītes palielinājumā

454 sekvenēšanas tehnoloģija

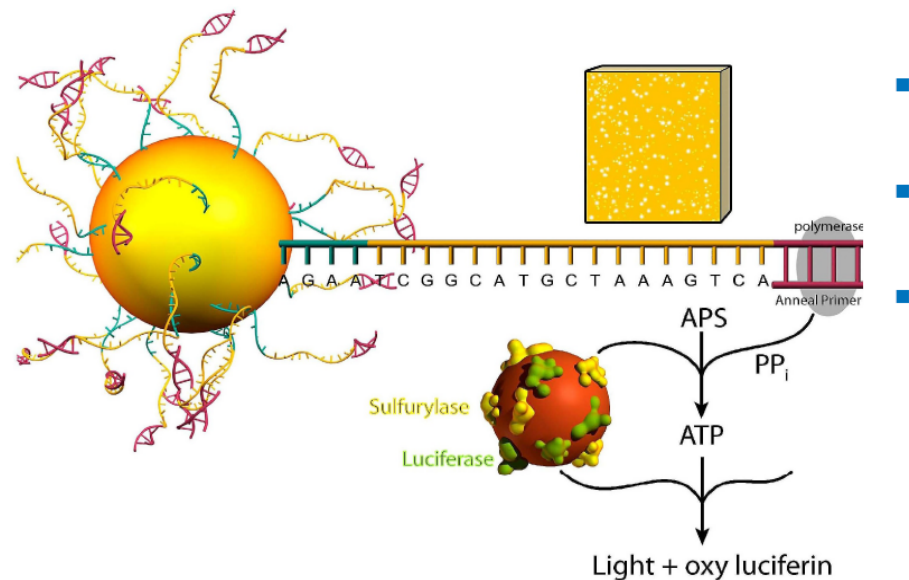
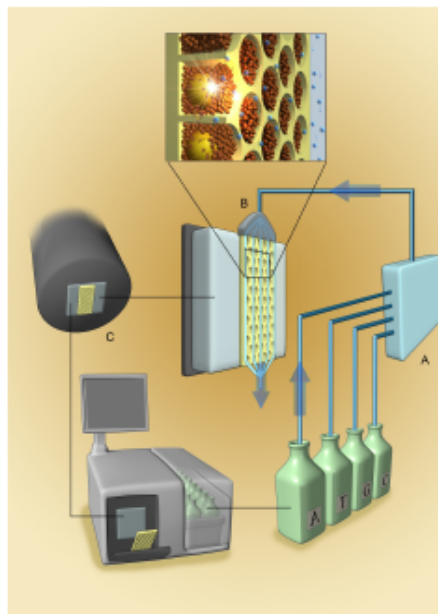
B - Sekvenēšana

7. To visu liek sekvenēšanas aparātā GS FLX.

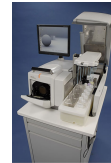
Pāri platei noteiktā kārtībā tiek pludināti nukleotīdi pa vienam veidam katrā reizē.

Ja bedrītē nonāk komplementārs nukleotīds, polimerāze to pievieno augošajai ķēdei un tiek ģenerēts gaismas signāls.

Gaismas signāls ir proporcionāls pievienoto nukleotīdu skaitam.

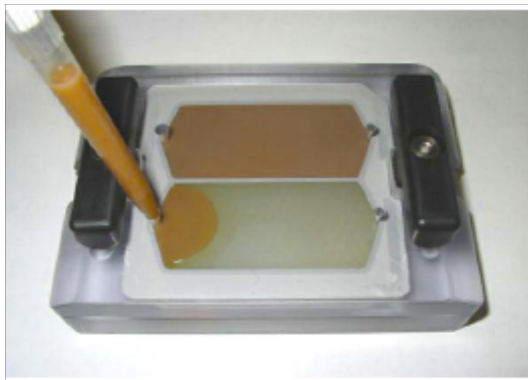


454 sekvenēšanas tehnoloģija



B - Sekvenēšana

Sekvenātors GS FLX.



Parauga uznešana

Illumina Solexa sekvenēšanas tehnoloģija

Sekvenēšanas tehnoloģijā izmanto atgriezenisku sintezējamās ķēdes termināciju ar fluorescenti iezīmētiem nukleotīdiem.

Sekvenēšanas apjomi – 0.3 – 1000 Gb 5 stundas līdz 6 dienas

Sekvences garums – 125-300 bp

Kvalitāte – 98,5%

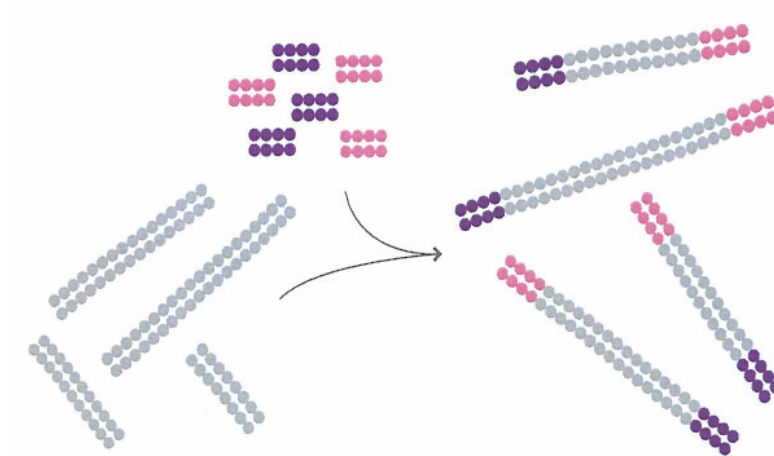
Pielietojums:

- Genoma sekvenēšana un pārsekvenēšana,
- Gēnu ekspresijas pētījumi, ieskaitot nelielu RNS atklāšanu un analīzi,
- Hromatīna imunoprecipitācija,
- *De novo* sekvenēšana.

Illumina Solexa sekvenēšanas tehnoloģija

DNS bibliotēkas veidošana

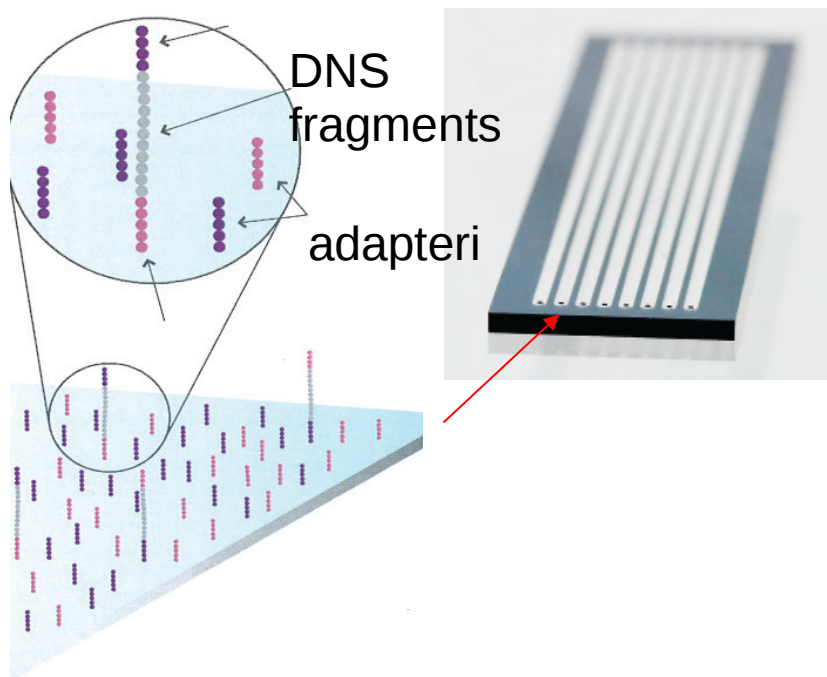
1. Genomiskā DNS tiek sašķelta.
2. Fragmenti tiek hibridizēti ar adapteriem (īsiem zināmas sekvences praimeriem).



Illumina Solexa sekvenēšanas tehnoloģija

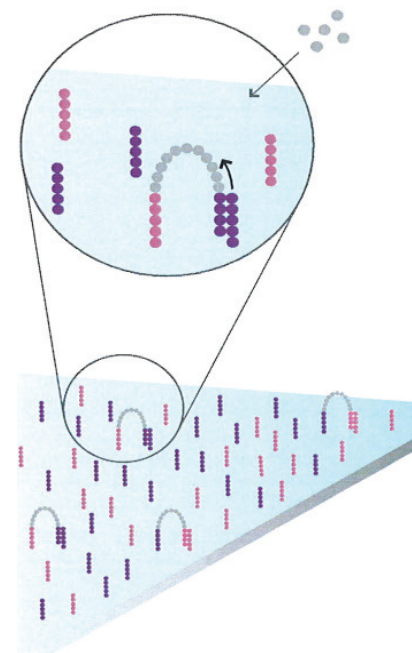
Parauga sagatavošana

3. ssDNS paraugi tiek uznesti uz slaida kanālu iekšpuses virsmas. Adapteri piesaistās pie slaida.



4. Brīvais adapters hibridizējas ar slaida virsmai piestiprināto praimeru, veidojas tilta struktūra.

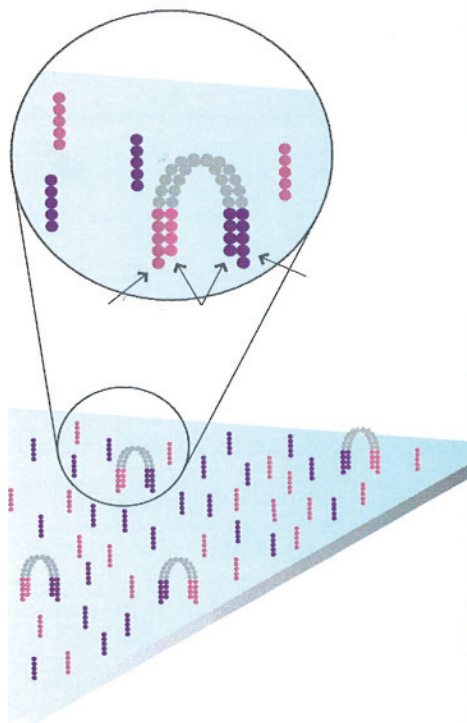
Tiek pievienoti nukleotīdi.



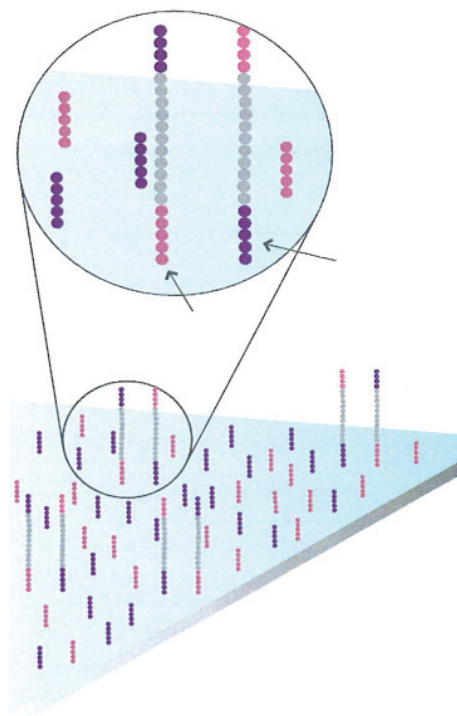
Illumina Solexa sekvenēšanas tehnoloģija

Parauga sagatavošana

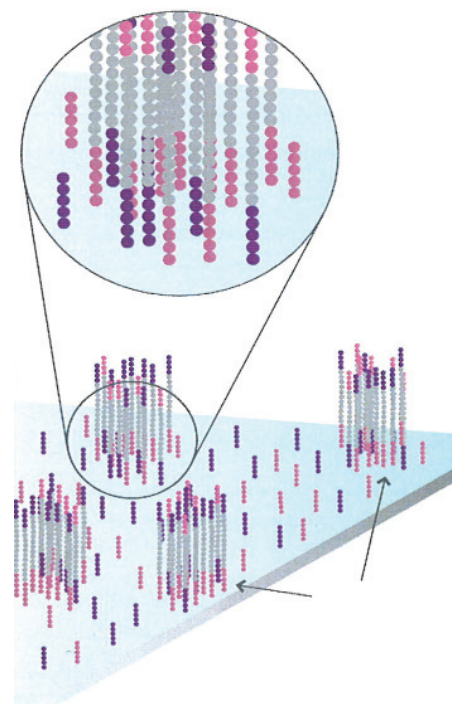
5. Polimerāze sintezē komplementāru ķēdi – veidojas dsDNS tiltiņš.



6. dsDNS tiek denaturēta, veidojas ssDNS.



7. Amplifikācija tiek pabeigta. Uz slaida virsmas ir cieši DNS fragmentu sakopojumi – polonijas (PCR kolonijas).

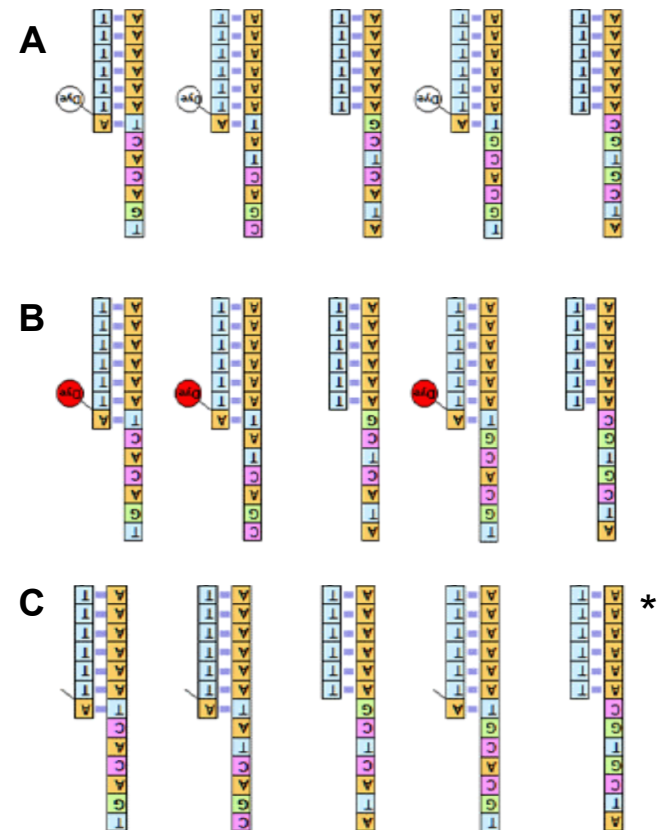
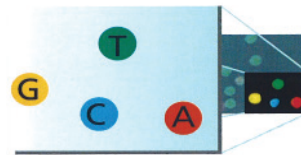
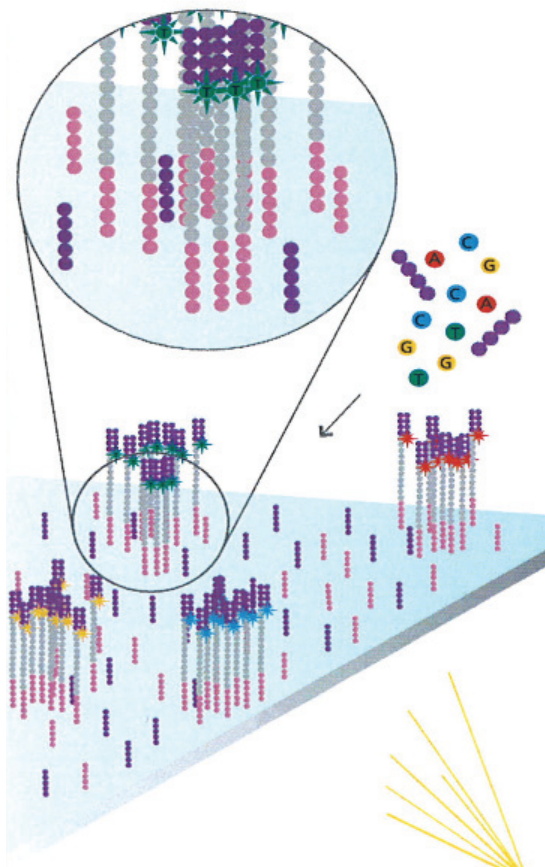


Illumina Solexa sekvenēšanas tehnoloģija

Sekvenēšana

8. Pievieno visus četrus iezīmētus nukleotīdus, praimerus, DNS polimerāzi. Polimerāze piesaista nukleotīdu.

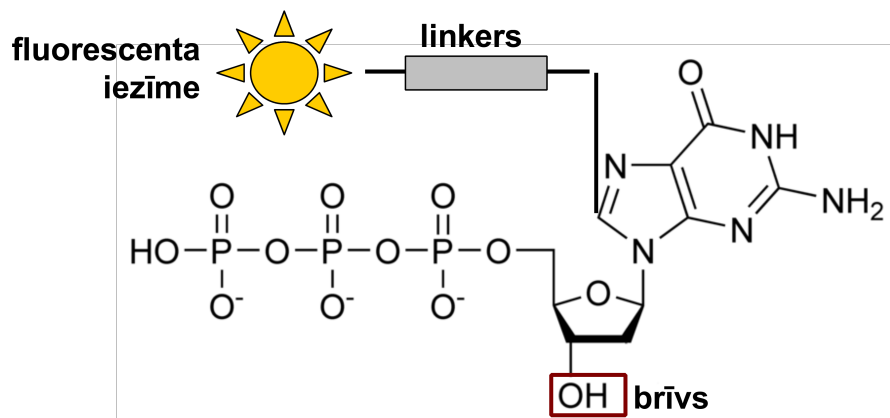
Liekie reaģenti tiek aizvākti. Paraugu apstaro ar lāzeri. Tiek fiksēts fluorescents signāls un noteikta pirmā bāze.



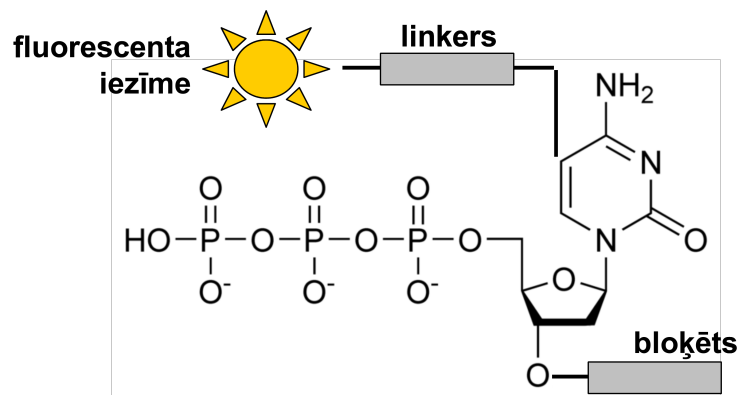
Illumina Solexa sekvenēšanas tehnoloģija

Sekvenēšana

- * Pēc signāla nolasīšanas tiek novākta fluorescentā iezīme un 3' terminācija.



Fluorescentās iezīmes molekula nodrošina arī 3' termināciju.

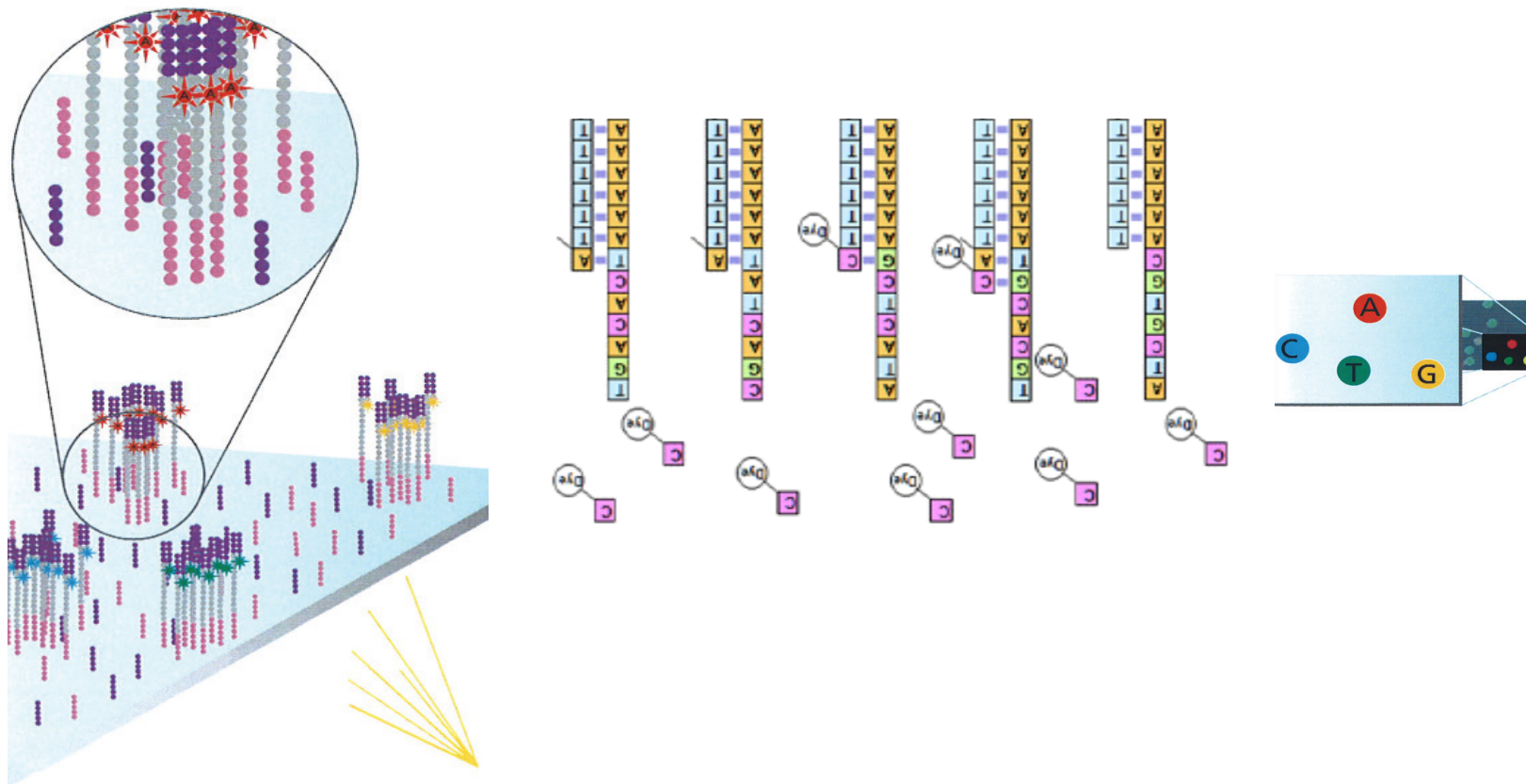


3' galu bloķē neliela ķīmiskā grupa, kas tiek atšķelta vienlaicīgi ar fluorescento iezīmi.

Illumina Solexa sekvenēšanas tehnoloģija

Sekvenēšana

9. Atkārto 8. ciklu un nolasa otru bāzi.

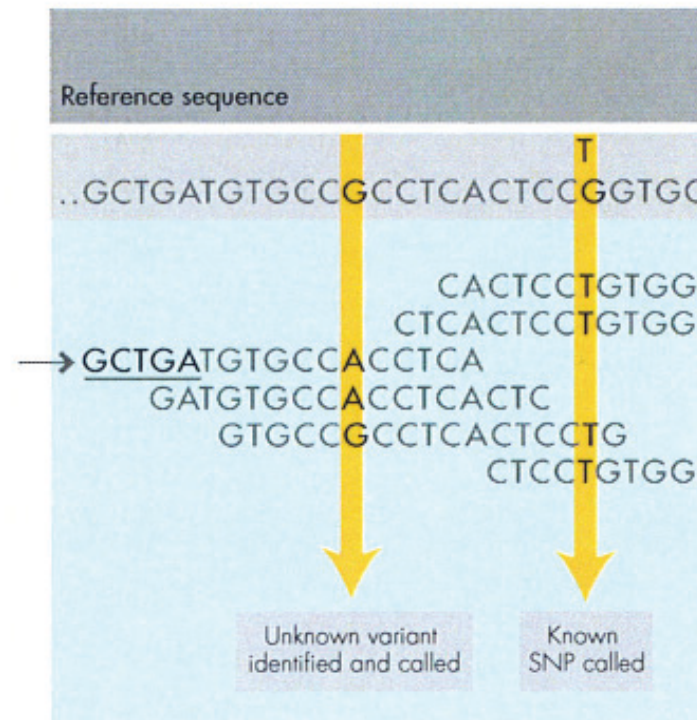
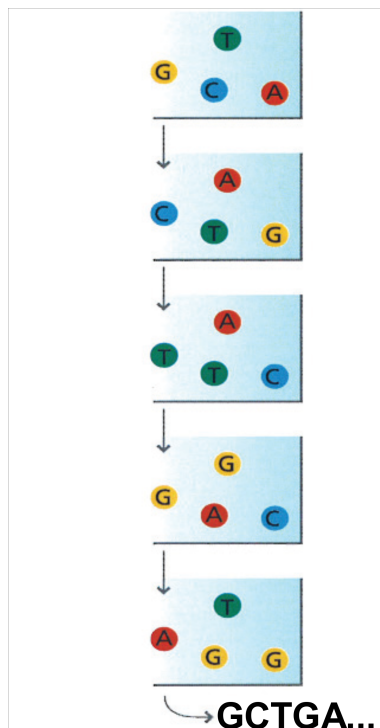


Illumina Solexa sekvenēšanas tehnoloģija

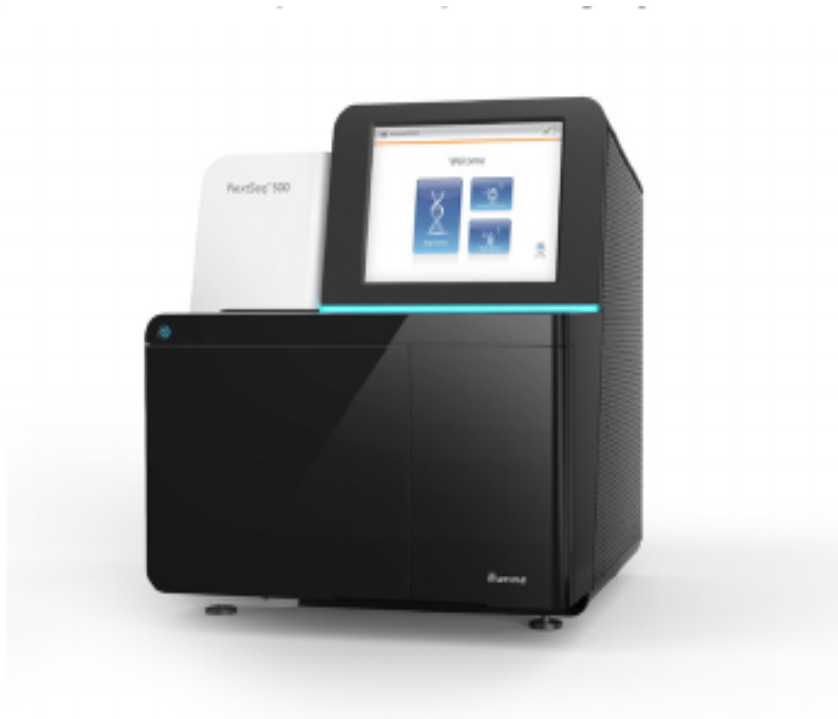
Sekvenēšana

Cikli tiek atkārtoti, kamēr iegūta pilna fragmenta sekvence. Ar šo metodi var nolasīt 125-300 bāzes.

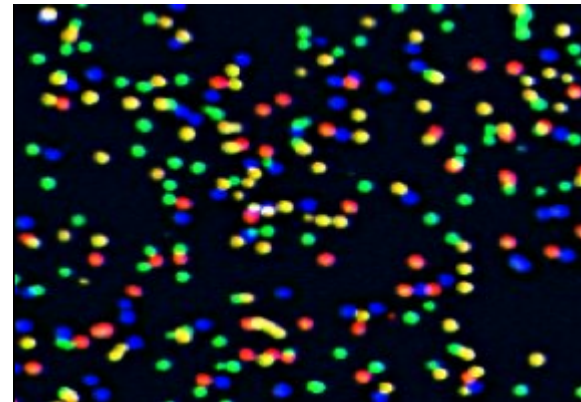
Dati tiek apstrādāti datorā un iegūta pilna parauga sekvence.



Illumina Solexa sekvenēšanas tehnoloģija



Illumina sekvenātors
NextSeq 500 Solexa
tehnoloģijai



Digitālās kameras
detektēta fluorescence.

SOLiD sekvenēšanas tehnoloģija

SOLiD tehnoloģijas pamats ir sekvenēšana ligējot.

Sekvenēšanas apjomi – 1 – 45 Gb dienā

Sekvences garums – 75 bp

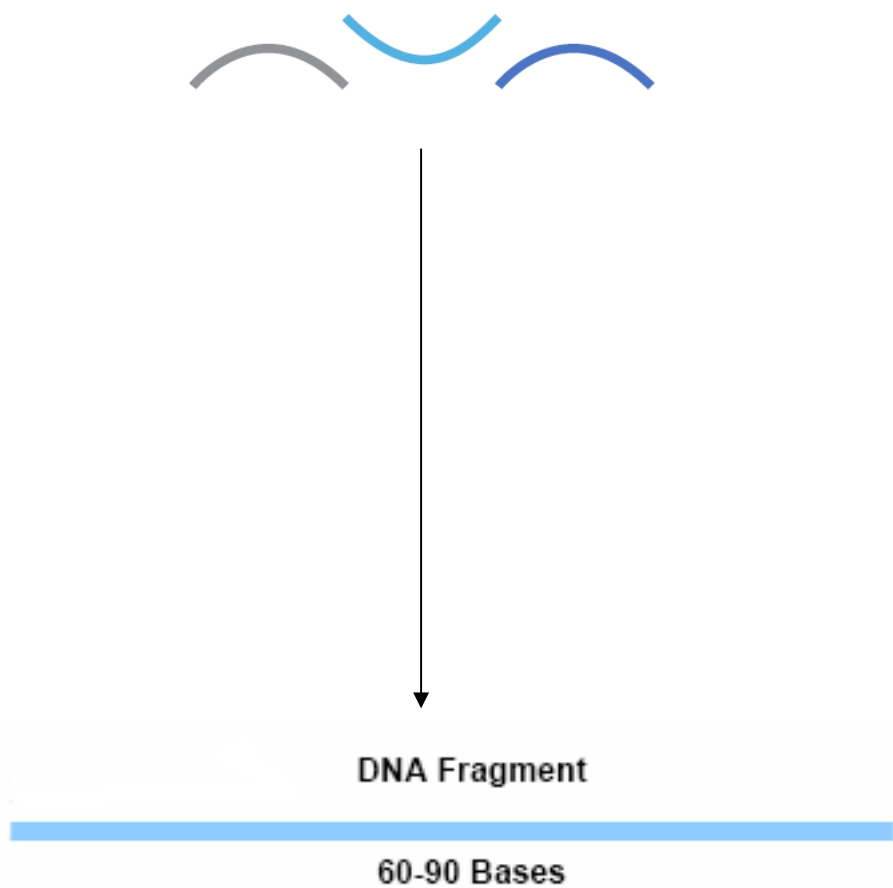
Kvalitāte – 99,99% Augsta precizitāte

Pielietojums:

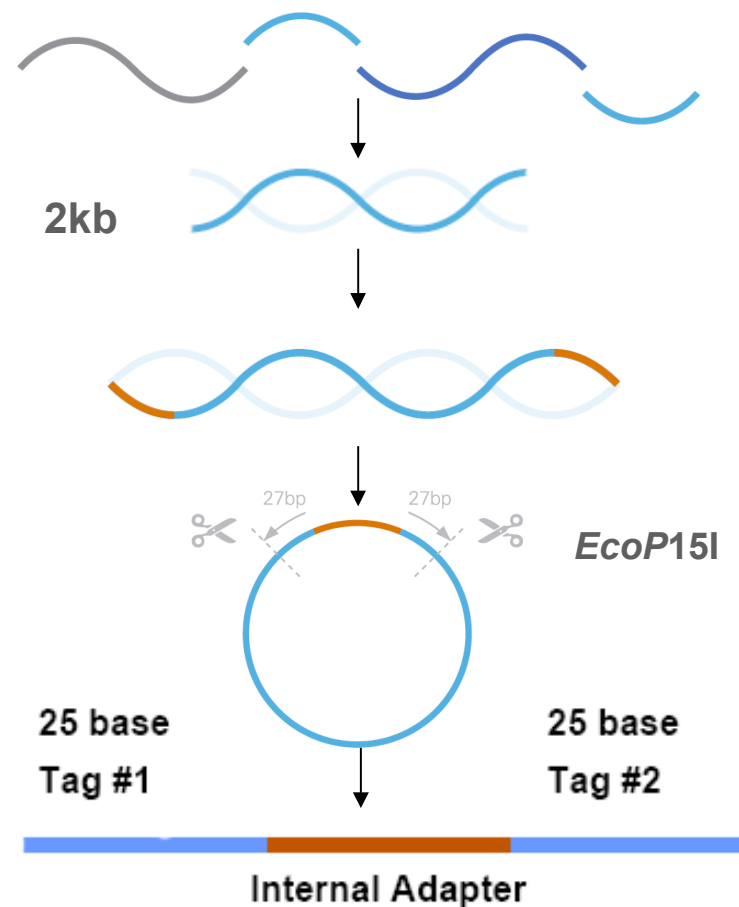
- Pārsekvenēšana,
- Gēnu ekspresijas pētījumi,
- MikroRNS aklāšana,
- Hromatīna imunoprecipitācija,
- Pilna genoma sekvenēšana.
- *De novo* sekvenēšana.

SOLiD sekvenēšanas tehnoloģija

Paraugu sagatavošana



Izmanto pārsekvenēšanai
(*directed resequencing*)

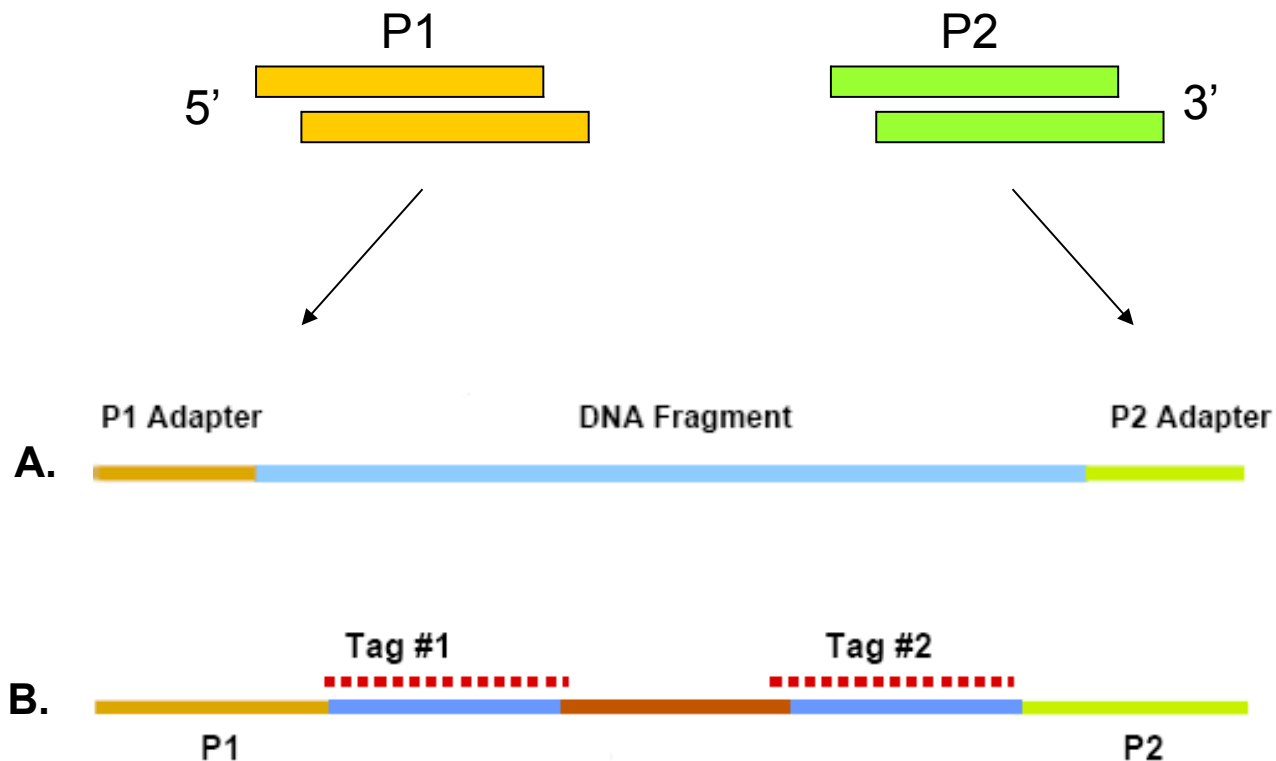


Izmanto pilna genoma sekvenēšanai

SOLiD sekvenēšanas tehnoloģija

Paraugu sagatavošana

2. Fragmentu galos tiek ligēti adapteri P1 un P2.

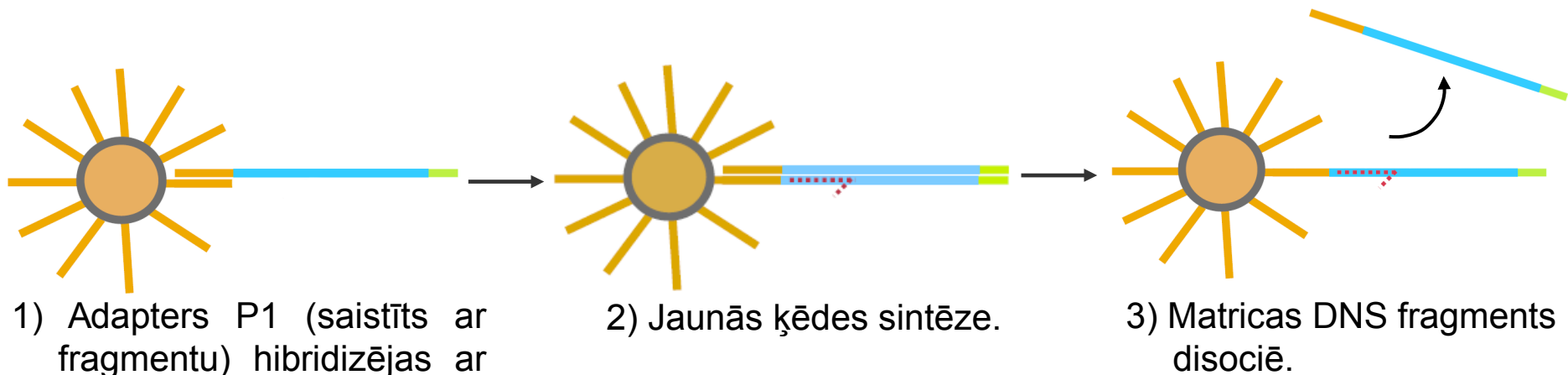


SOLiD sekvenēšanas tehnoloģija

Paraugu sagatavošana

3. Emulsijas PCR

[Reakcijas maisījumam papildus tiek pievienoti praimeri P1 un P2].



1) Adapters P1 (saistīts ar fragmentu) hibridizējas ar praimeri P1 (saistīts pie lodītes).

2) Jaunās ķēdes sintēze.

3) Matricas DNS fragments disociē.

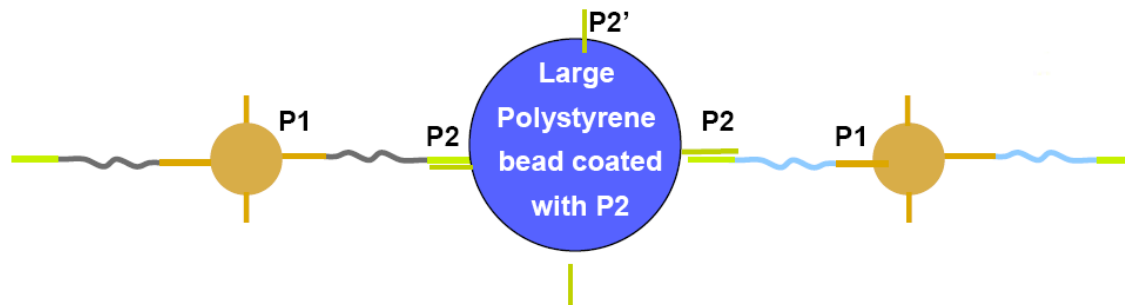


Rezultātā uz lodītes virsmas ir liels skaits fragmenta kopiju.

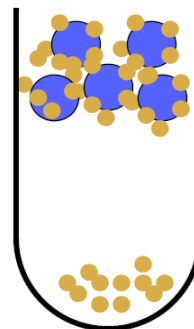
SOLiD sekvenēšanas tehnoloģija

Paraugu sagatavošana

4. Mikroreaktori tiek izjaukti. Tiek atsijātas tās lodītes, kas nav saistītas ar DNS fragmentiem.



1) Ar P2 adapteri fragmentu saturošās lodītes piesaistās pie polistirola lodītēm.

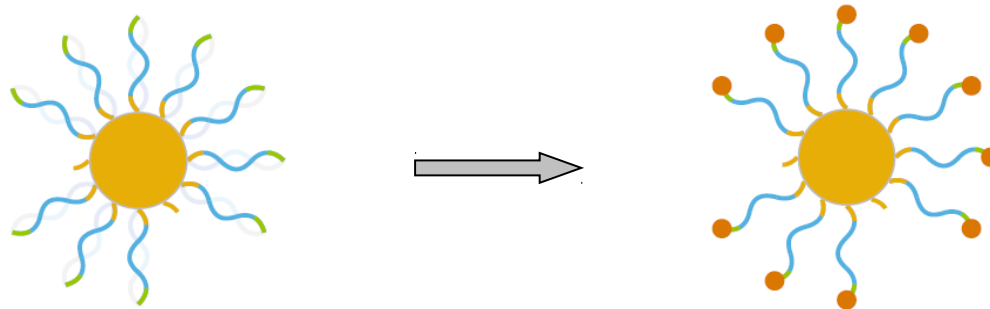


2) Tiek veikta glicerīna gradienta centrifugēšana.

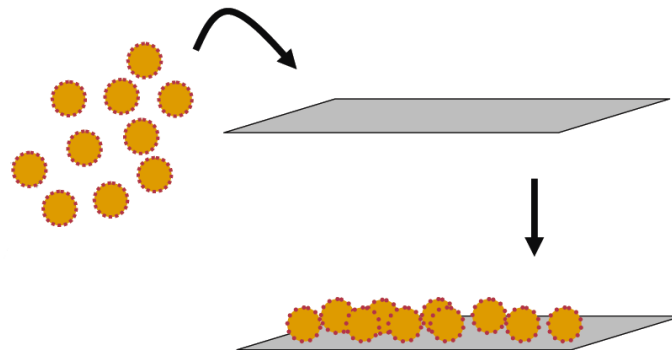
SOLiD sekvenēšanas tehnoloģija

Paraugu sagatavošana

5. Pie lodītēm piesaistīto fragmentu 3' gals tiek modificēts.



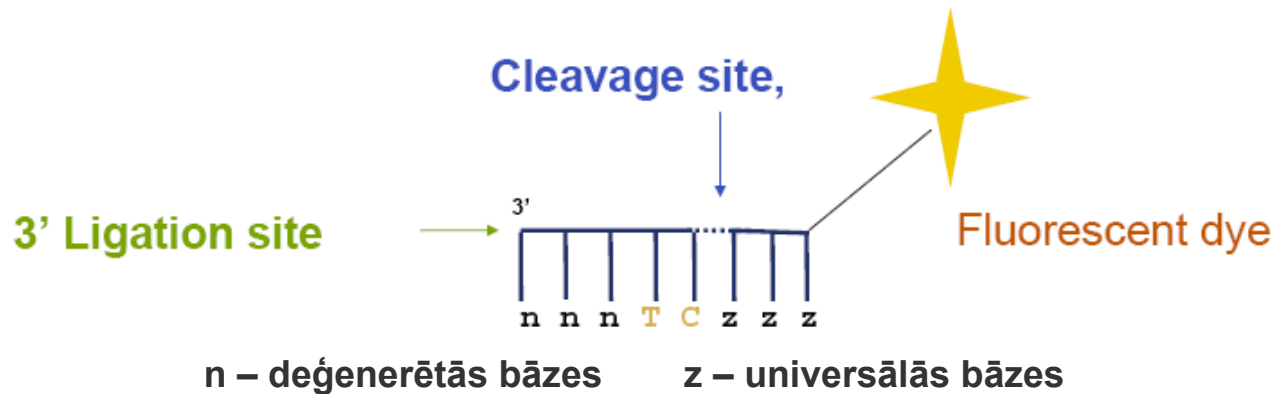
6. 3' modificētās lodītes tiek izgulsnētas uz slaida. Lodīšu kovalentu piesaistīšanos stikla slaidam nodrošina 3' modifikācija.



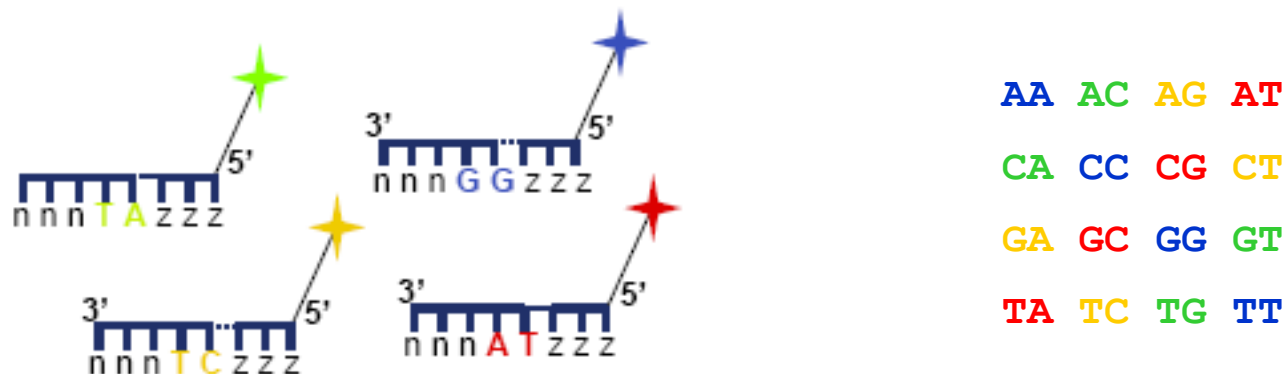
SOLiD sekvenēšanas tehnoloģija

Sekvenēšana

A. Sekvenēšanas reakcijā tiek izmantotas fluorescenti iezīmētas zondes



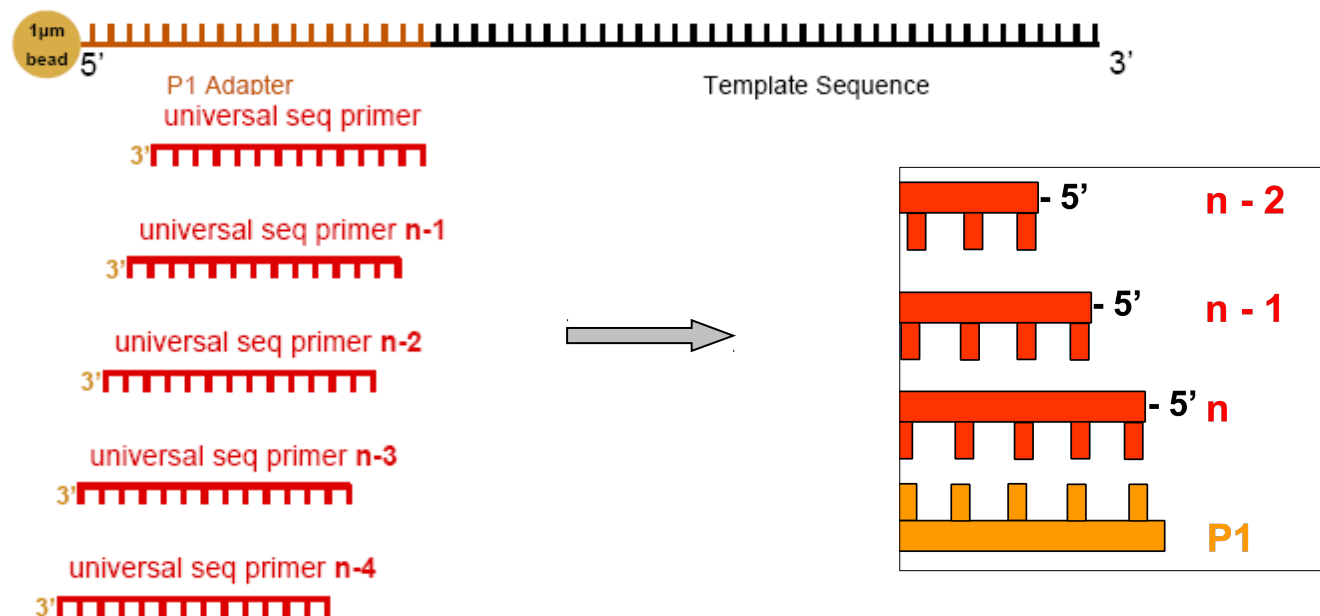
Ir 16 zondes – 16 dinukleotīdi, kas ir iezīmēti ar četrām fluorescentām krāsām.



SOLiD sekvenēšanas tehnoloģija

Sekvenēšana

B. Pieci praimeri, kas ir komplementāri P1 adapterim.



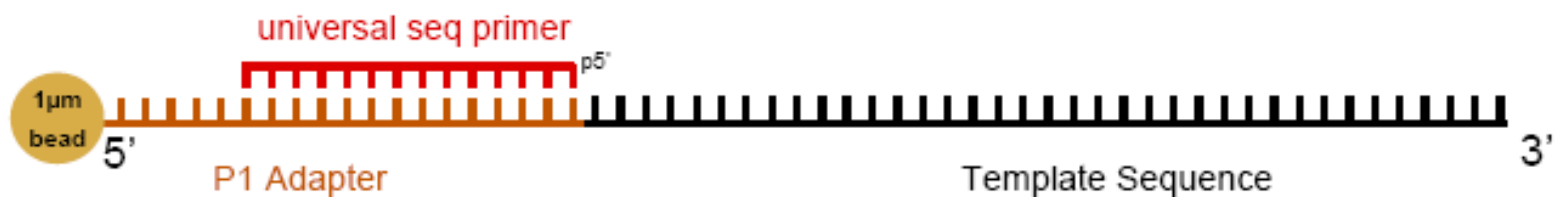
Katra praimera sekvence ir nobīdīta par 1 nukleotīdu adaptera 5' virzienā.

SOLiD sekvenēšanas tehnoloģija

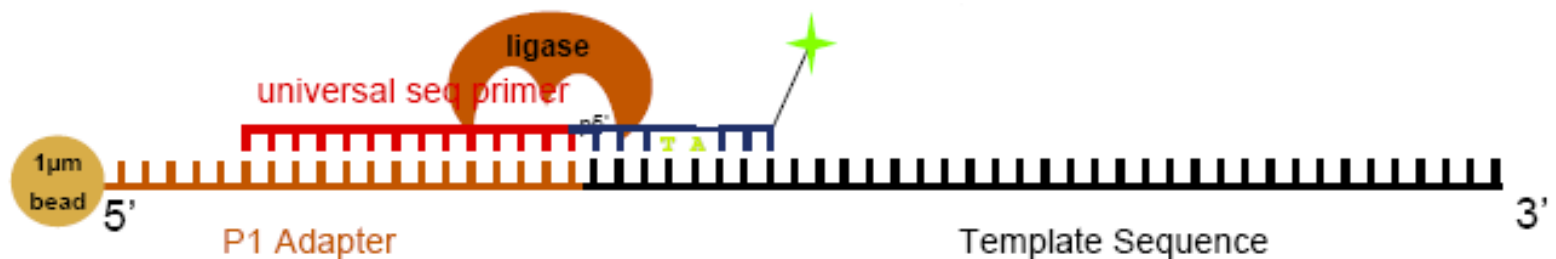
Sekvenēšana ar ligēšanu

I. Solis

1. Praimeris n hibridizējas ar adapteri P1.



2. Hibridizējas atbilstošā zonde, kuru ligāze piešuj praimera 5'galam.

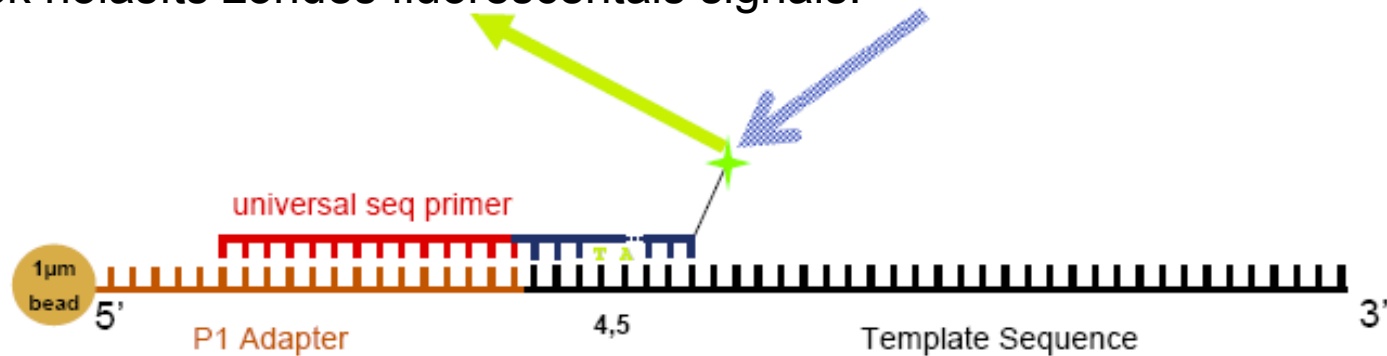


SOLiD sekvenēšanas tehnoloģija

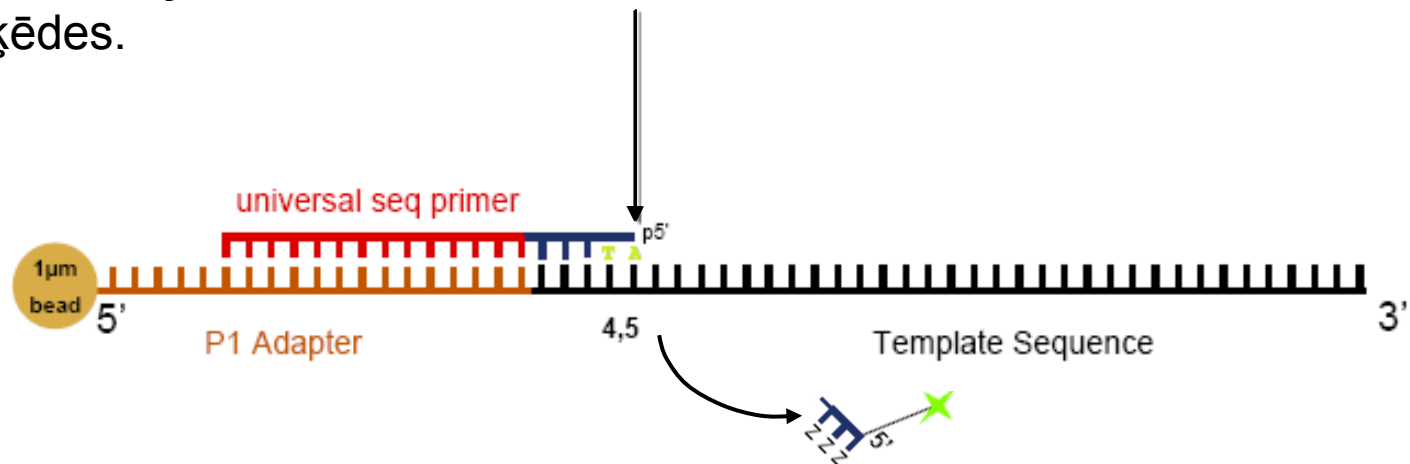
Sekvenēšana ar ligēšanu

I.Solis

3. Tiek nolasīts zondes fluorescentais signāls.



4. Zonde tiek sašķelta. Tas atbrīvo fluorescējošos iezīmi un 5' fosfātu uz augošās ķēdes.

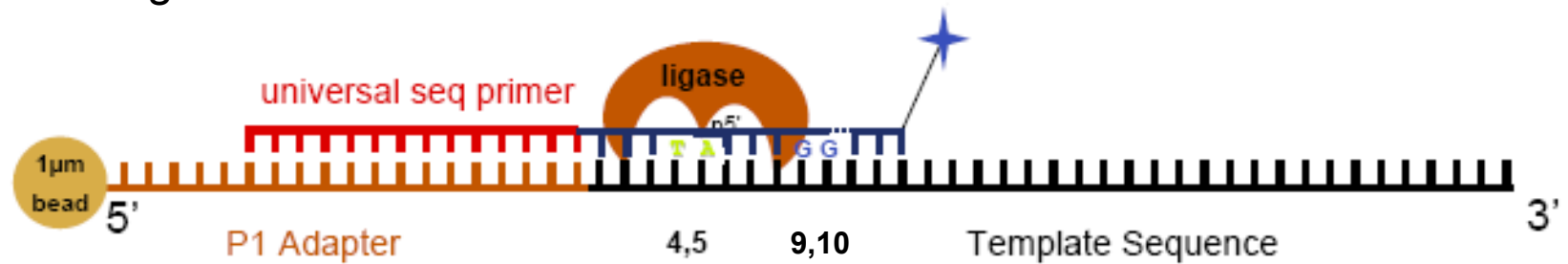


SOLiD sekvenēšanas tehnoloģija

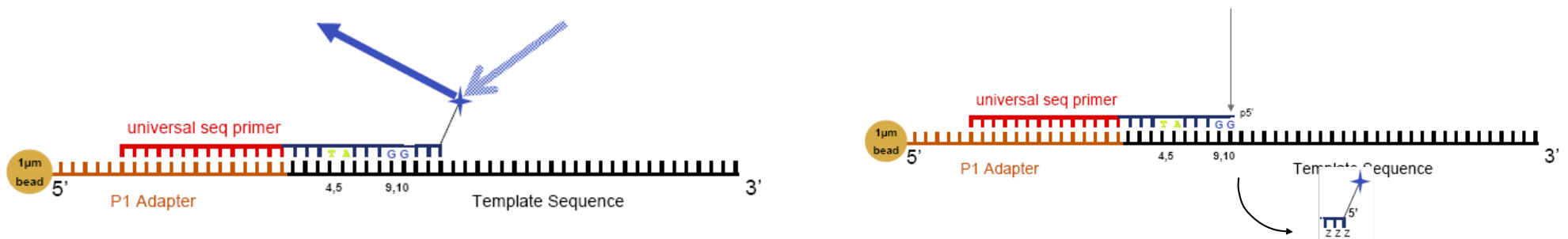
Sekvenēšana ar ligēšanu

I.Solis

5. Notiek nākamās zondes hibridizēšanās un ligēšana augošās ķēdes 5'galā.



Atkārtojas viss cikls...

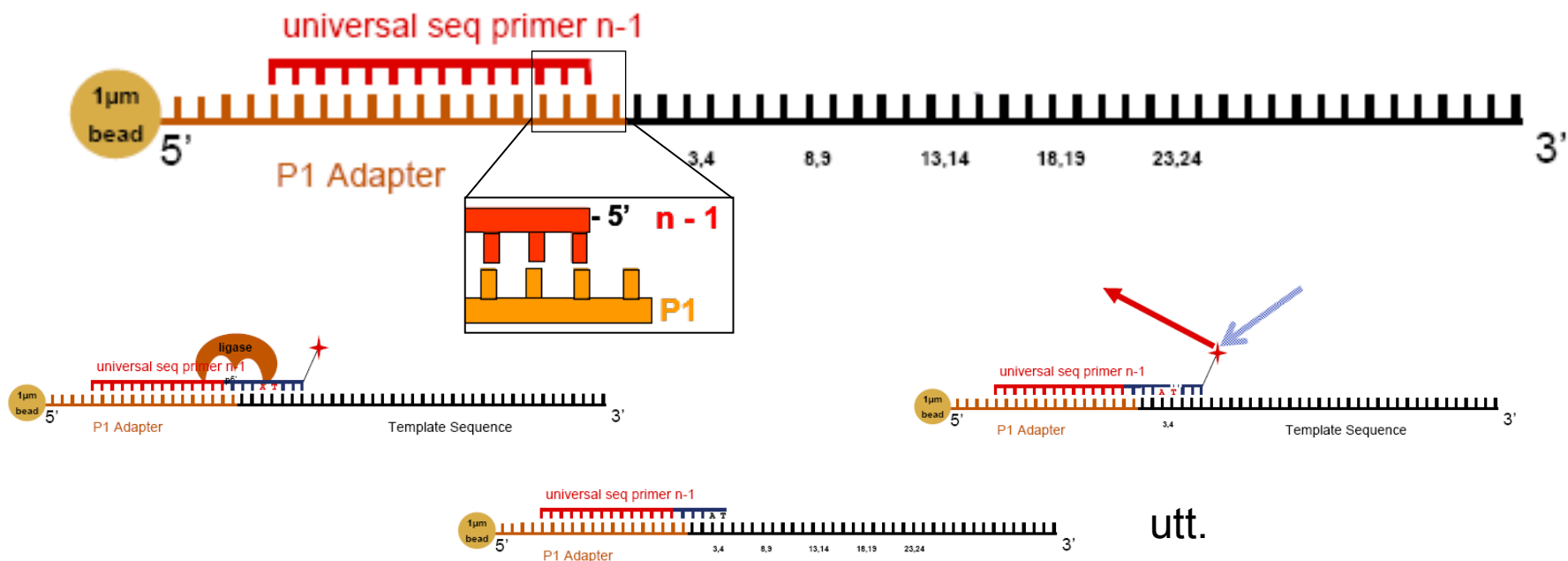


SOLiD sekvenēšanas tehnoloģija

Sekvenēšana ar ligēšanu

II. Solis

1. Prameris n - 1 hibridizējas ar adapteri P1.



Kopā ir 5 soļi, katrā 5-7 ligēšanas cikli, kuru rezultātā iegūst 25-35 nukleotīdus garu sekvenci katram fragmentam.

SOLiD sekvenēšanas tehnoloģija

Sekvenēšana

Dinukleotīdu atšifrēšana

Katra krāsa apzīmē 4nk kombinācijas.



A C G G T C G T C G T G T G C G T

1. A - **zaļš** => A-C
2. C - **sarkans** => C-G
3. G - **zils** => G-G

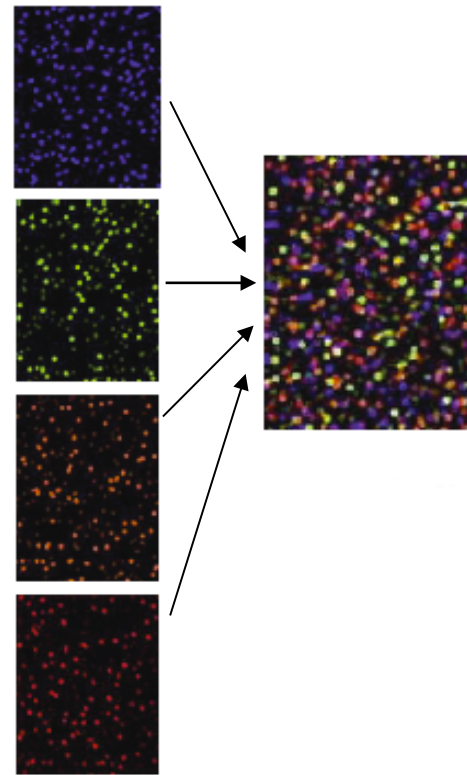
Zināms pēc adaptera
sekvences

SOLiD sekvenēšanas tehnoloģija

Sekvenēšana ar ligēšanu



SOLiD sekvenātors



Digitālās kameras detektēta fluorescence.

Trešās paaudzes sekvenēšanas metodes

Vairāki paraugi vienā reakcijā

Nepieciešams veidot DNS bibliotēku

Nav nepieciešama DNS amplifikācija

Pacific Biosciences (PacBio) SMRT sekvenēšanas tehnoloģija

Metodes pamatā ir vienas DNS molekulas sekvenēšana reālā laikā (*Single molecule, real-time sequencing – SMRT*).

Nav nepieciešams amplificēt DNS

Sekvenēšanas apjomi – 1Gb 1h

Sekvences garums – **4200-8500** bp

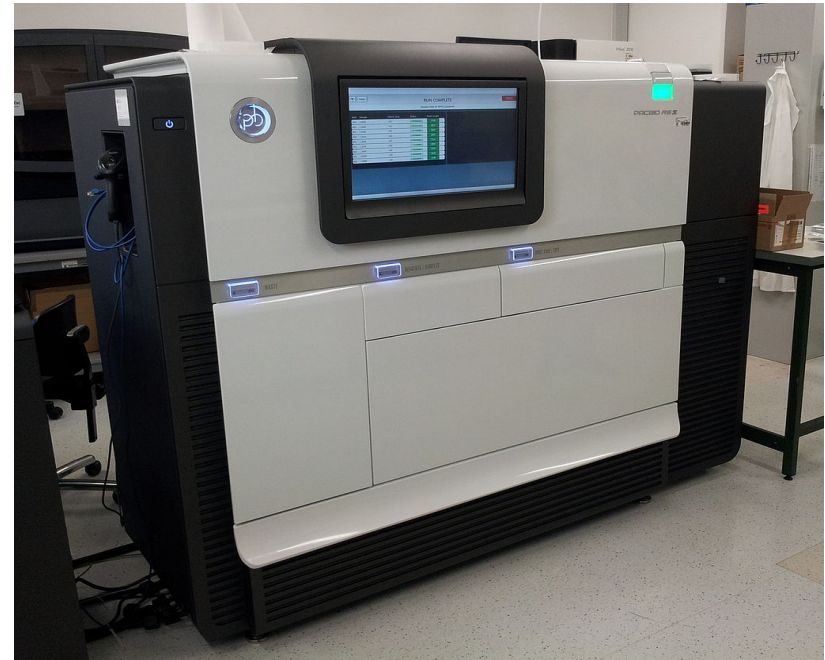
Kvalitāte – 99,999%

Otrās paaudzes sekvenēšanas iespējas +

Ļauj noteikt DNS modifikācijas

RNS izoformas

Sarežģītu genomu sekvenēšana



PacBio RSII sekvenators

SMRT sekvenēšanas tehnoloģija

SMRT Cells



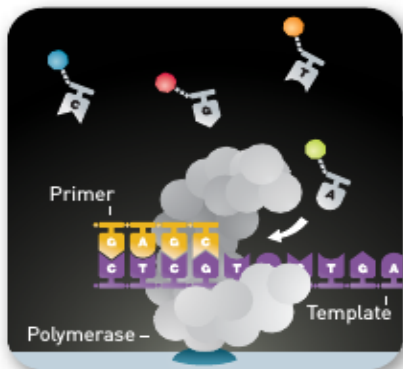
Sekvenēšana notiek SMRT “šūnās”

Katrā SMRT “šūnā” ir daudzas mazas bedrītēs, kurām netiek cauri gaisma

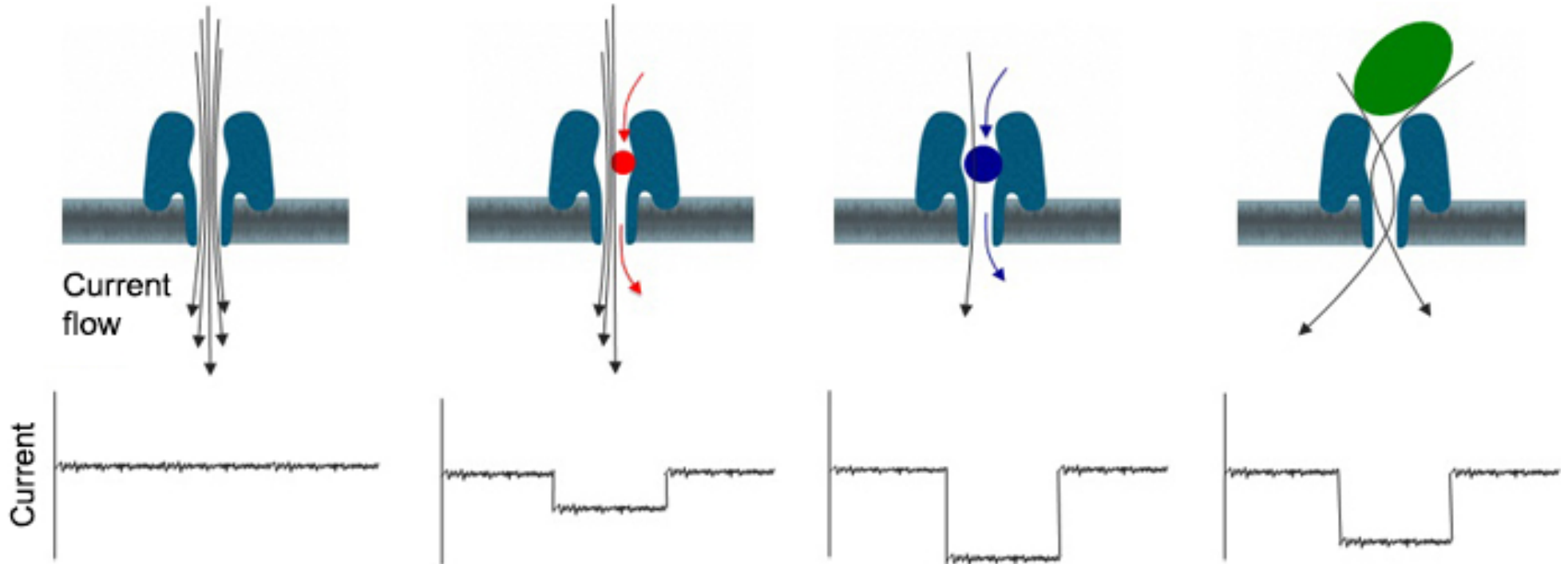
Zero-Mode Waveguides



Phospholinked Nucleotides



Katrā bedrītē tiek piestiprināta polimerāze. Sekvenēšanā izmanto modificētus nukleotīdus – fosfosaistītos nukleotīdus



Kopsavilkums

Pirmās paaudzes metodes

Maxam-Gilbert jeb ķīmiskās degradācijas metode

Sangera enzimātiskā metode

Otrās paaudzes metodes

Ion Torrent

454

Solexa

SOLiD

Trešās paaudzes metodes

PacBio SMRT