

Helgenomsekvensering

Khadija Ahmad, Astrid Hovind

Bioingeniørutdanningen, Avdeling for ingeniørfag, Høgskolen i Østfold, Norway

khadija@hiof.no, astridho@hiof.no

Bakgrunn

Mikroorganismer har store innvirkninger på mennesket - både positive og negative. Mens noen av disse spiller en essensiell rolle i kroppens ytre forsvar, vil andre kunne føre til sykdom. Det er et stadig behov for utvikling av effektive og lønnsomme metoder til påvisning, og identifikasjon av mikrober, samt for overvåkning av sykdomsutbrudd og deteksjon av antimikrobiell resistens. Til dette kan man bruke helgenomsekvensering, som går ut på å kartlegge hele arvestoffet.

Når man skal sekvensere DNA, er det en rekke trinn man må gjennom, og hvert trinn må overvåkes nøye. Dette innebærer alle stegene som følger fra man har et prøvemateriale som skal sekvenseres, til man får ut bearbeidet sekvenseringsdata.

1 Ekstrahering og isolering av DNA

DNA-et eksponeres ved å lysere (ødelegge) cellene. Dette kan blant annet gjøres kjemisk, mekanisk, ved å koke materialet eller med enzymer.

Etter ekstrahering skal DNA-templatet isoleres, og til det benyttes hovedsakelig silica eller løsningsmidler.

2 Konstruere DNA-bibliotek

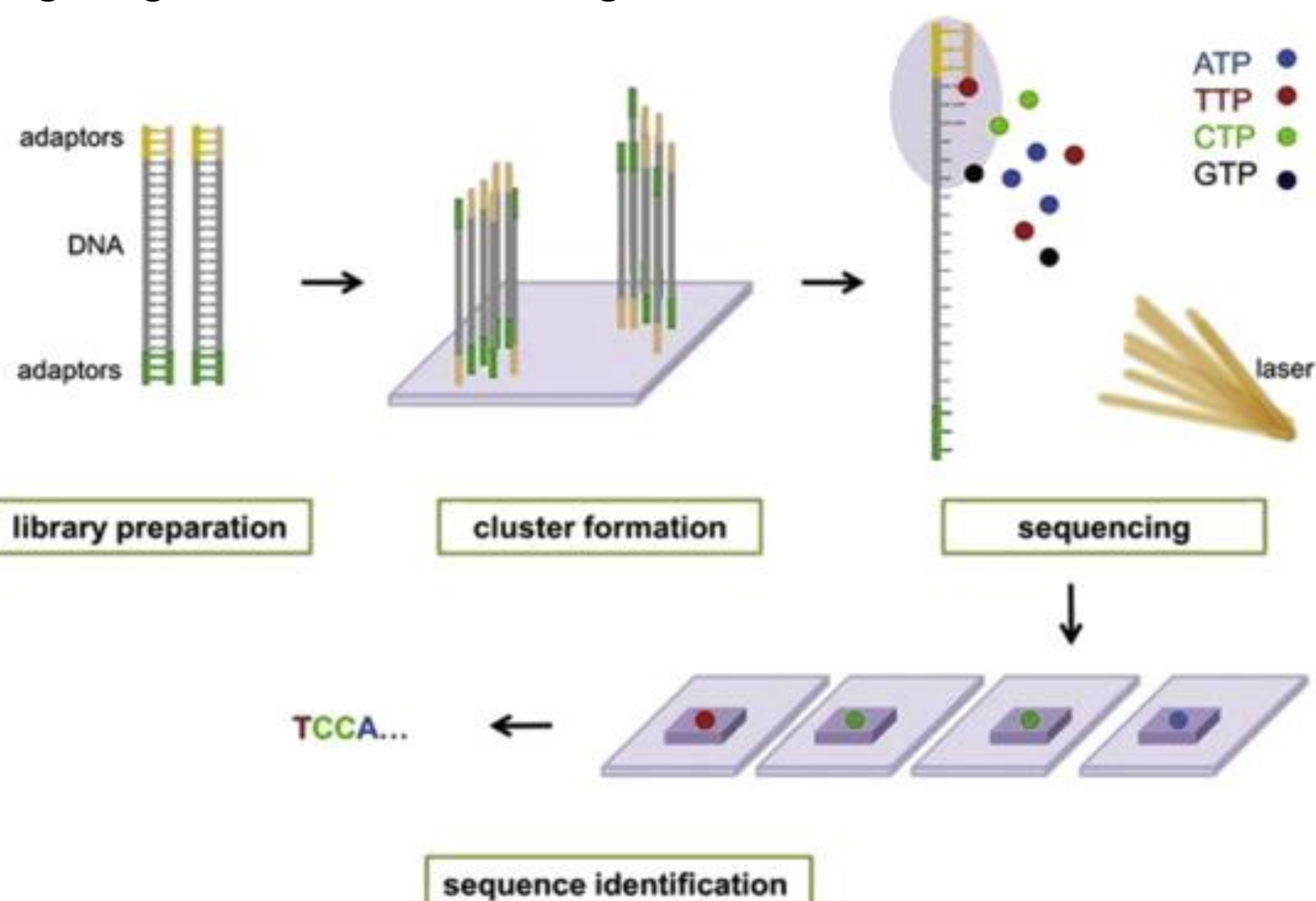
DNA-templatet amplifiseres ofte via PCR, før kopiene kuttes i mindre biter (fragmenter). Fragmentene merkes med adaptorproteiner, slik at de kan gjenkjennes under sekvensering.

3 Sekvensering

Ved sekvensering skal frie nukleotider bindes til komplementære baser ved hjelp av enzymet DNA-polymerase.

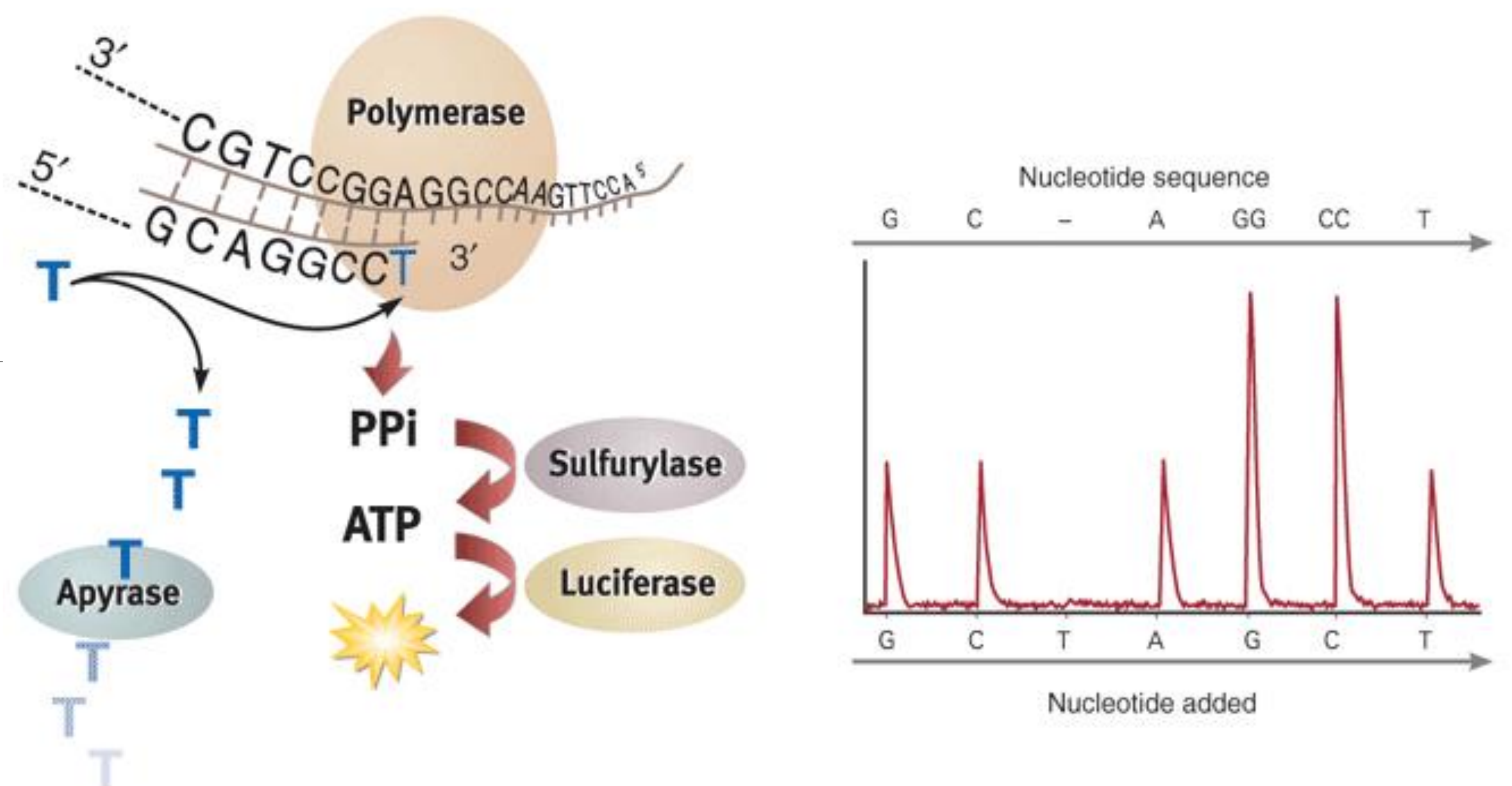
Illumina-sekvensering

DNA-fragmenter amplifiseres via broamplifisering, slik at det dannes ansamlinger av kopiene (clusters). Clusterne sekvenseres med nukleotider som er merket med hvert sitt fluorescerende molekyl. Hver gang DNA-polymerase inkorporerer et nukleotid, frigjøres det et fargestoff som blir eksitert av en laser. Et kamera detekterer bølglengden som sendes fra fargestoffet.



Pyrosekvensering

Hver gang DNA-polymerase inkorporerer et nukleotid, frigjøres pyrofosfat (PPi). Frigjøringen av pyrofosfat setter i gang en rekke enzymatiske reaksjoner som ender med produksjon av lys. Mengden lys er proporsjonal med antall PPi som frigjøres, og dermed hvor mange av nukleotidet som ble satt inn.



4

Etterbehandling av data

Resultatet er mange små sekvensfragmenter som må settes sammen igjen til en hel, sammenhengende sekvens. Dette kan gjøres ved hjelp av en rekke programvarer. I tillegg kan det benyttes ulike programmer og databaser for å identifisere sekvenser, til å se etter for eksempel virulensgener og antibiotikaresistensgener mfl.

Kvalitetskontroll

Siden helgenomsekvensering består av mange steg er det avgjørende at hvert steg kontrolleres før man går videre til det neste. Det er viktig å kontrollere blant annet det isolerte DNA-et, DNA-biblioteket og sekvenseringen.