

Hvordan fungerer Nanopore-sekventering?

Hvad sker der, når man afpippeterer sin prøve i en Nanopore flowcelle? Hvordan kan den bestemme basesekvenserne af DNA-stykkerne i prøven?

I denne fil skal du lære om hvordan teknikken bag Nanopore-sekventering fungerer. Derefter skal du lære om barcoding. Dvs. den DNA-"stregkode" hver gruppe sætter på deres DNA-prøve, så computeren bagefter kan sortere i hvilke grupper prøverne stammer fra.

Nanopore-sekventering

Se følgende video og besvar spørgsmålene:

<https://nanoporetech.com/resource-centre/introduction-nanopore-sequencing>

1. Beskriv hvordan en dobbeltstrenget DNA-sekvens (dsDNA) sekventeres.
2. Forklar hvilken rolle følgende enheder spiller under sekventeringen (min. 0:20 og frem):
 - Membran
 - Tether (tøjr)
 - Nanopore
 - Adaptorsekvens
 - Motorprotein
2. Forklar, hvordan baserne i DNA-molekylet aflæses som spændingsændringer af flowcellen (Min. 0:35 og frem).
3. Find de fire basers kemiske struktur i din biologibog. Forklar, hvordan de er forskellige i størrelse og polaritet.
4. Forklar nu samlet, hvordan sekventeringen foregår.

Se også følgende video: <https://www.youtube.com/watch?v=CGWZvHli3i0>

Lav screenshots som viser poreproteinets struktur (det optræder fx fra minut 0:12-0:20).

5. Beskriv nanopore-proteinets struktur ud fra dine screenshols. Hvilke sekundære, tertiære og kvarternære strukturer kan du genkende? Kvarternære strukturer er ikke angivet, men kan ses ved at proteinet er sat sammen af et antal ens underenheder. Identificer disse.
6. Forklar, hvordan man med mutationer i DNA kan ændre porens indre struktur og diameter.

Nanopore-proteinet stammer fra et såkaldt pore-dannende toxin, som fx dannes af bakterier. Se fx https://en.wikipedia.org/wiki/Pore-forming_toxin

7. Forklar hvilken rolle poredannende toxiner spiller for de celler, som producerer dem.

Motorproteinet DNA-helikase er aktivt i replikationen (kopiering) af DNA.

8. Forklar, hvilken rolle motorproteinet DNA-helikase har i cellen, når DNA skal replikeres. Se fx animationen: <https://www.youtube.com/watch?v=vx7plwC2FyE>

I en Flongle flowcelle er der en chip, som indeholder 126 kanaler. I hver kanal er der en nanopore. Læs evt. mere om opbygningen på denne side: <https://nanoporetech.com/how-it-works>. Under sekventeringen kan man følge på skærmen, hvilke porer der er aktive og hvilke der er i gang med at sekventere.

Under basecallingen, dvs. når computeren henter resultaterne, sammenlignes sekvenserne løbende. Hvis nogle af sekvenserne indeholder læsefejl, kan man ved at sammenligne med de øvrige finde den mest sandsynlige sekvens. Hvis der er mere end 5 ens baser i træk, kan poren fx have svært ved at skelne, hvor mange der er.

9. Tabellen viser fire læsninger fra samme prøve. Hvilken sekvens vil du mene den mest sandsynlige? Skriv den i femte række i skemaet.

Læsning 1	AATGCGCGCCCCCCTTATATAACTT...
Læsning 2	AATGCGCGCCCCCCTTATATAACTT...
Læsning 3	AATGCGCGCCCCCCTTATATAACTTA...
Læsning 4	AATGCGCGCCCCCCTTATATAACTT...
Mest sandsynlige sekvens	

Barcoding af prøver

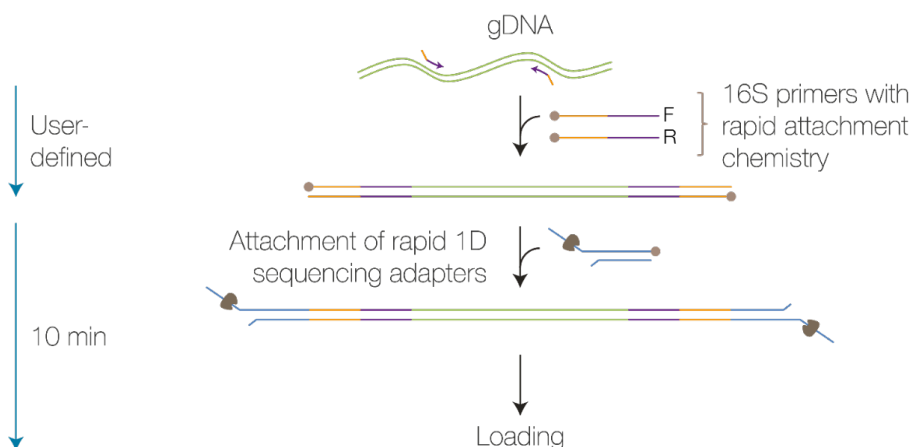
Det forhold at sekventeringen sker i flere nanoporer ad gangen, gør at man kan blande flere prøver sammen og sekventere dem på samme tid. Man skal dog kunne adskille sekvenserne igen bagefter.

Det gør man med barcoding, DNA-stregkoder. En barcode er en bestemt DNA-sekvens, som bindes til enden af DNA-strengene i prøven.

Hver prøve får hver sin barcode. Når basecallingprogrammet får resultaterne, opdeles de efter barcode.

Figuren viser, hvordan barcodes sidder i enden af de to primere, som bruges til PCR-processen (Forward- og Reverse-primere). Dermed bliver PCR-produkterne forsynede med barcodes.

Primerne indeholder også en sekvens som før sekventeringen kan bindes til Rapid Adaptors (RAP), de enheder, som skal styre DNA-strengen gennem nanoporen, når sekventeringen foregår.



Figur 1. Barcoding, PCR og binding af RAP før sekventering. Figur fra Nanoporetech.

10. Forklar hvordan PCR-processen normalt foregår ud fra en figur fra en af dine bøger.
11. Forklar, hvordan PCR med barcoding er forskellig fra PCR-processen vist i bogen. Inddrag figur 1.