

Oversigt over forsøget og teori

Indhold

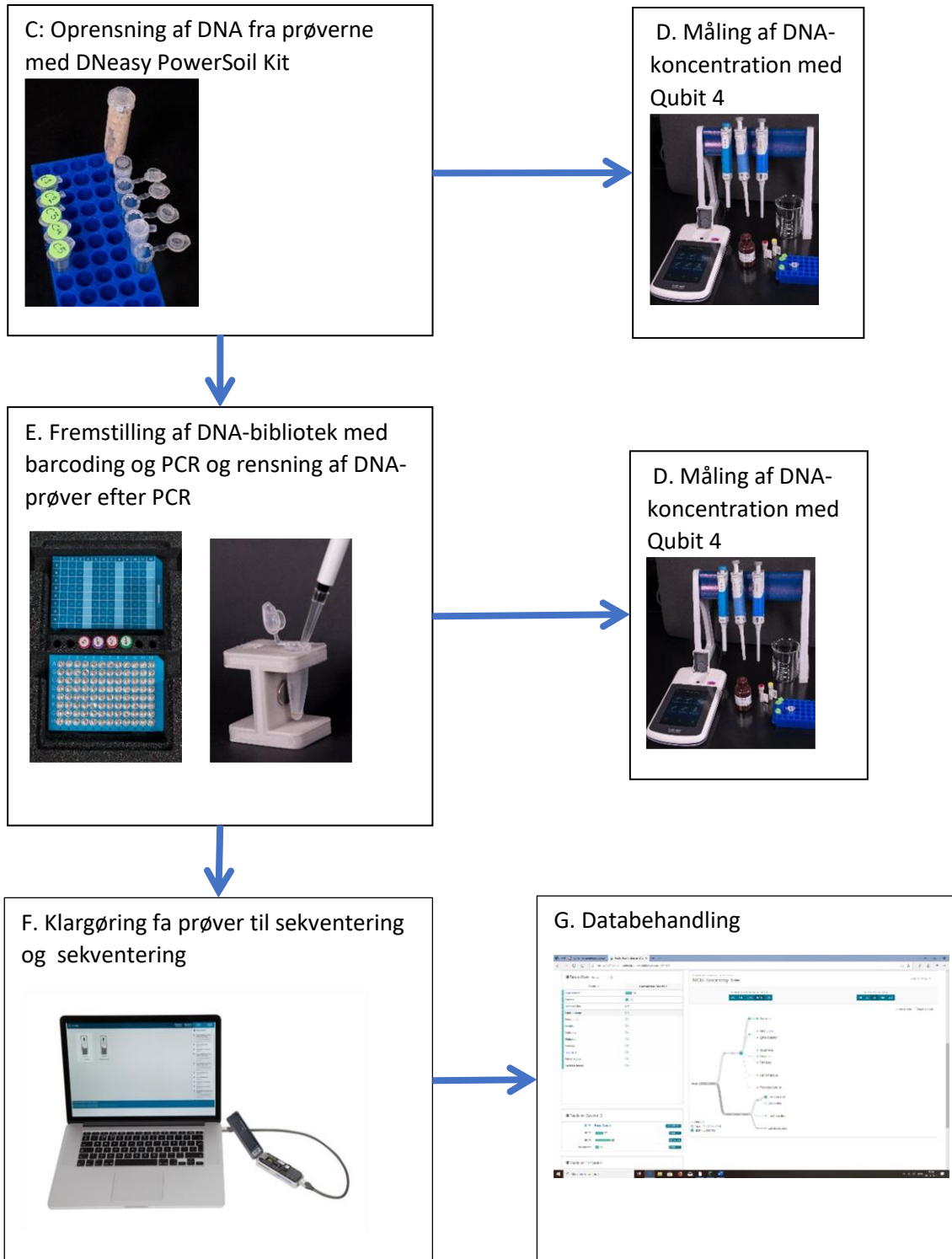
Oversigt over forsøget og teori.....	1
Tidsplan for procedurer.....	1
Oversigt over procedurerne.....	2
Teori.....	3
Nanopore-sekventering.....	3
Barcoding af prøver	5
Bestemmelse af bakterietyper ud fra 16S rRNA-genet	6

Tidsplan for procedurer

Protokollen omfatter følgende procedurer:

Blok	Procedure	Vejledning
1	Oprensning af DNA fra prøverne med DNeasy PowerSoil Kit	C
2	Måling af DNA-koncentration i prøven med Thermofisher Qubit4	D
	Fremstilling af DNA-bibliotek med barcoding og PCR	E
	Arbejde med teori bag Nanopore-sekventering	B
3	Rensning af DNA-prøver efter PCR	C
	Arbejde med teori bag Nanopore-sekventering	B
4	Måling af DNA-koncentration i prøven med Thermofisher Qubit4	D
	Klargøring af prøven til sekventering og loading af flowcelle	D
	Sekventering og basecalling med programmet MinION	D
	Arbejde med teori bag Nanopore-sekventering	B
5	Analyse af data med programmet Epi2me	E

Oversigt over procedureerne



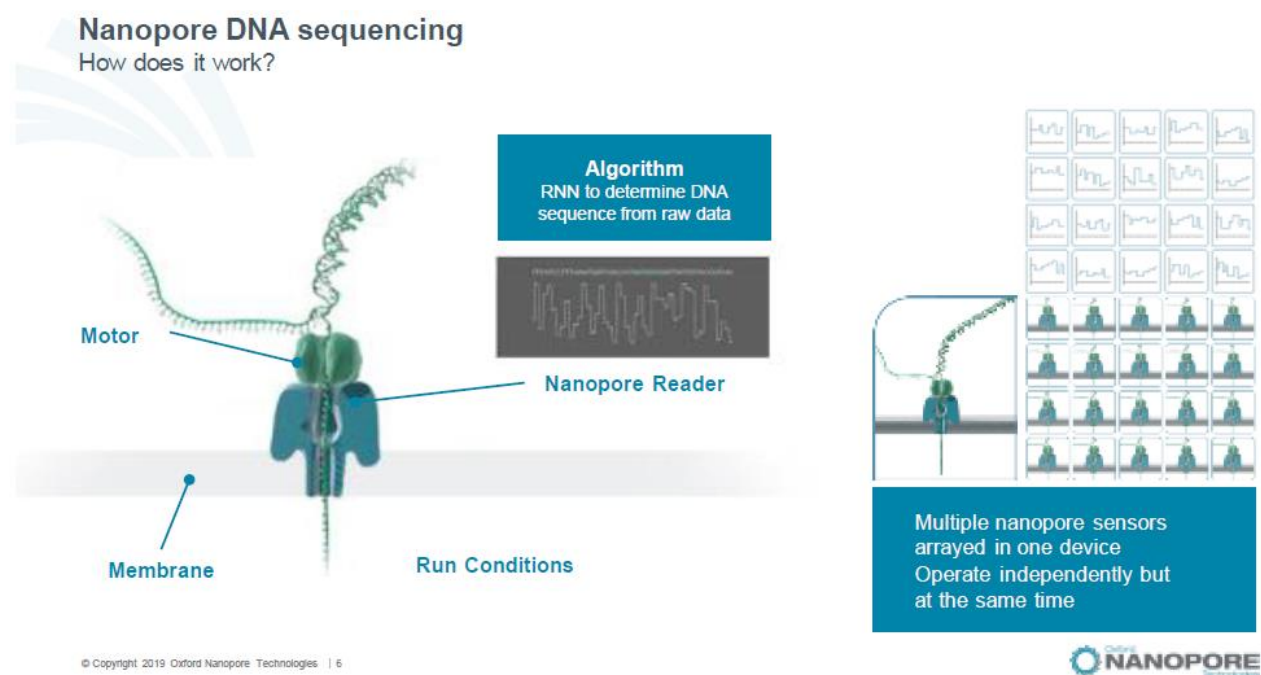
Teori

Nanopore-sekventering

Se følgende video og besvar spørgsmålene:

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

1. Beskriv hvordan en dobbeltstrengt DNA-sekvens (dsDNA) sekventeres.
2. Forklar hvilken rolle følgende enheder spiller under sekventeringen:
 - Membran
 - Tether (tøjr)
 - Nanopore
 - Adaptorsekvens
 - Motorprotein



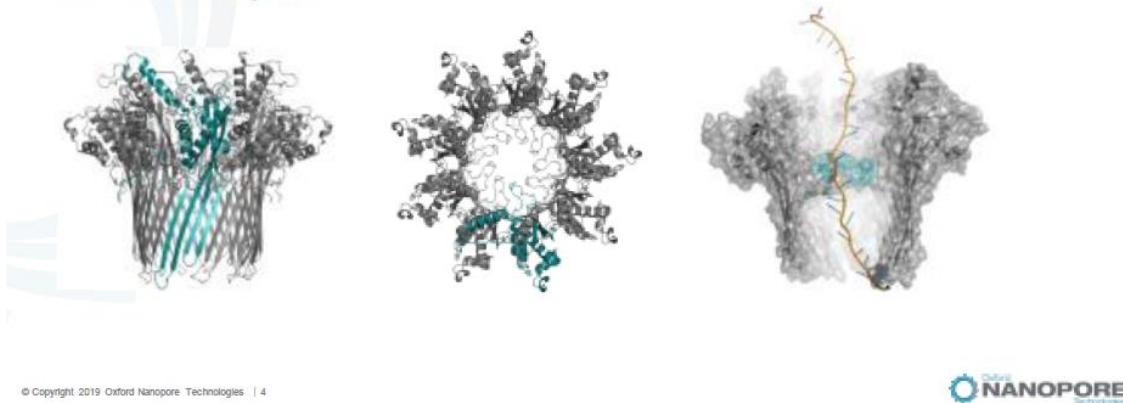
Figur 1. Princippet i Nanopore-sekventering

Figur 1 viser princippet i hvordan Nanopore-sekventering foregår.

3. Forklar hvordan sekventeringen foregår ud fra figur 1.

The heart of our technology

- ⚡ In nature, protein nanopores function as gateways between two systems
- ⚡ We have carefully engineered protein nanopores through mutating key residues in the barrel of the pore



Figur 2. Nanoporens struktur

Figur 2 viser nanopore-proteinets struktur. Se også følgende video:

<https://www.youtube.com/watch?v=CGWZvHli3i0>

- Beskriv nanopore-proteinets struktur.
- Forklar, hvordan man med mutationer 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

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

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

- Forklar, hvilken rolle motorproteinet DNA-helikase har i replikationsprocessen. Se fx animationen: <http://www.biokemibogen.dk/animationer/replikationafdna/>

I en Flongle flowcelle er der en chip, som indeholder 126 kanaler. I hver kanal er der en nanopore. Læs 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. 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.

- 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

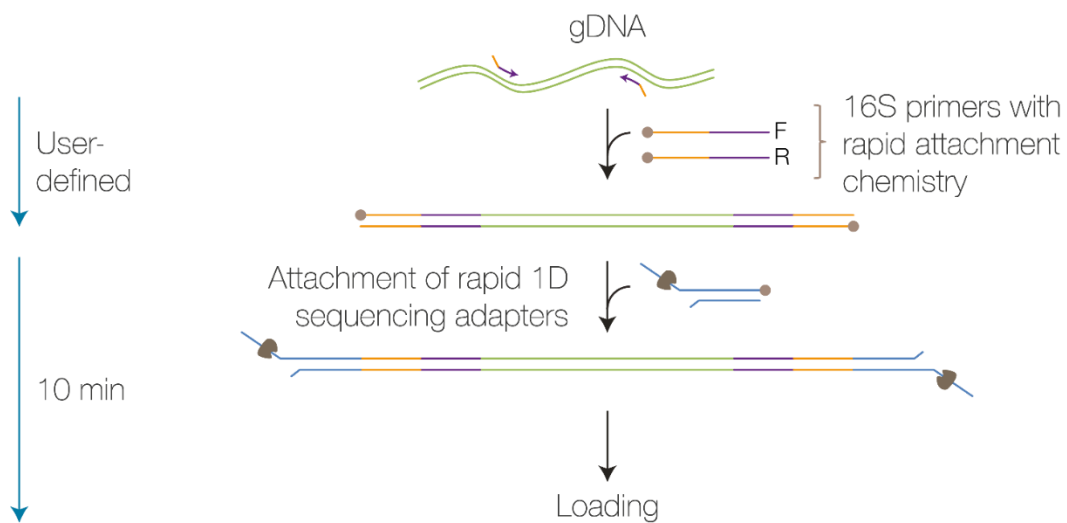
Det forhold at sekventeringen sker i flere nanoporer ad gangen, gør at man kan blande flere prøver sammen og sekventere dem på samme tid. Man skal dog kunne adskille sekvenserne igen bagefter.

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.

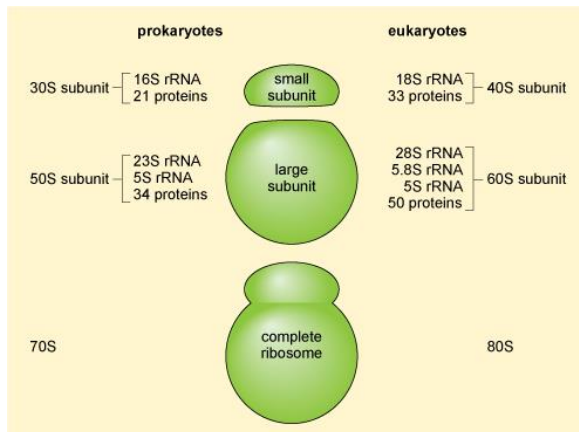
Primerne indeholder også en sekvens som før sekventeringen kan bindes til Rapid Adaptors (RAP), de enheder, som skal styre DNA-strengen gennem nanoporen, når sekventeringen foregår.



Figur 3. Barcoding, PCR og binding af RAP før sekventering.

9. Forklar hvordan PCR-processen normalt foregår. Anvend en figur fra dine bøger.
10. Forklar, hvordan PCR med barcoding er forskellig fra PCR-processen vist i bogen. Inddrag figur 3.

Bestemmelse af bakterietyper ud fra 16S rRNA-genet



Figur 4. Ribosomernes underenheder i procaryoter og eucaryoter.

Som vist i figur 4, består ribosomer af to underenheder, en stor og en lille. Underenhederne er opbyggede af ribosomalt RNA (rRNA) og proteiner. Hos bakterier består den lille underenhed af 16S rRNA. Generne for rRNA er konservative, dvs. at der kun optræder relativt få mutationer i DNA-sekvensen mellem forskellige bakterietyper sammenlignet med andre afsnit af kromosomet. De kan derfor anvendes til at sammenligne fjerntbeslægtede organismer.

11. Forklar hvilken funktion ribosomerne har i cellen.
12. Forklar, hvorfor konservative gener kan være gode til at sammenligne fjerntbeslægtede organismer?
13. Forklar hvad der skal karakterisere de DNA-sekvenser, du ville anvende, hvis du skulle identificere individer indenfor samme art fx for at undersøge, hvem der har været på et gerningssted?

Genet for 16S rRNA er blevet en standard for sammenligning af bakterier. Dvs. at der findes omfattende databaser over 16S rRNA-gener med mange forskellige bakterier. De benyttes til at identificere, hvilke bakterier man har i sin prøve. Programmet Epi2Me som vi benytter, sammenligner resultaterne med en sådan database.

14. Giv eksempler på hvor og hvornår det kan være interessant at identificere bakterier ved hjælp af DNA-sekventering.
15. Giv eksempler på hvor og hvornår det kan være interessant at kunne foretage DNA-sekventering i felten med et lille sekventeringsapparat som en Nanopore Flongle Flowcell.
16. Giv forslag til andre metoder til at identificere hvilke bakterier der er i en prøve. Hvilke metoder anvendte man fx før DNA-sekventering blev opfundet?