

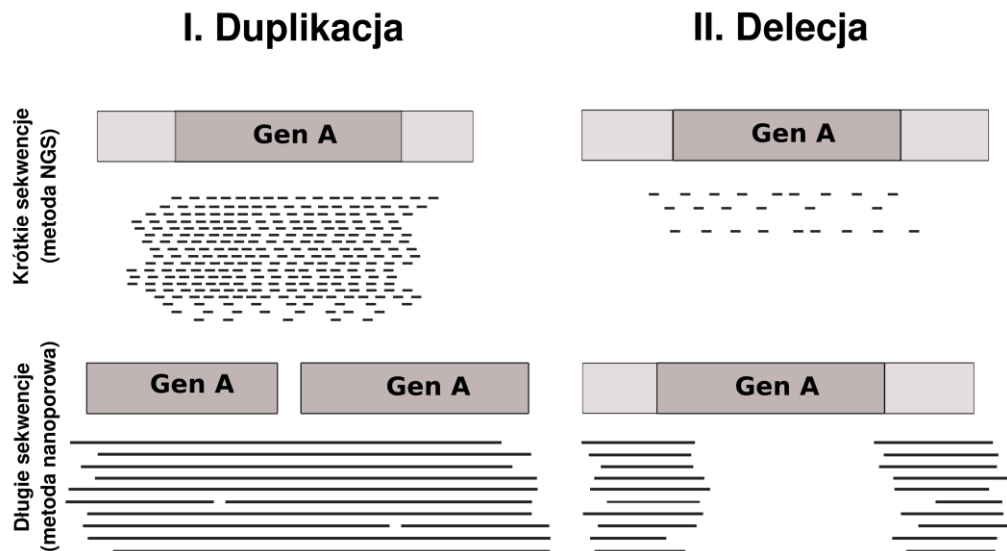
Sekwencjonowanie nanoporowe metodą badania zmienności genetycznej roślin

Anastasiia Satyr

Instytut Chemii Bioorganicznej PAN

Ze względu na siedzący tryb życia, rośliny mają ograniczone możliwości adaptacji do zmieniającego się środowiska. Natomiast charakteryzują się one wysoce zmiennym materiałem genetycznym. W DNA roślin zmienne regiony często obejmują jeden lub więcej genów, a nawet całe cząsteczki DNA – chromosomy. Zjawisko zmienności możemy określić np. jako nabycie dodatkowych kopii genów – *duplikacja*, albo utrata genów – *delecja*. W naszym eksperymencie postanowiliśmy zbadać zmienne regiony DNA, w których zakodowane są geny RLP (ang. *receptor-like protein*) u rośliny modelowej rzodkiewnika pospolitego (*Arabidopsis thaliana*). RLP to grupa genów kodujących białka, których funkcje związane są z odpornością lub wrażliwością roślin na drobnoustroje chorobotwórcze. Udział RLP wykazano w kształtowaniu odpowiedzi na takie choroby jak np. zaraza ziemniaka czy mączniak rzekomy u kapustowatych. Do zrealizowania naszego celu wykorzystujemy zbiór ekotypów rzodkiewnika – roślin pochodzących z różnych części świata, co jest idealnym źródłem badania zmienności. Obecność duplikacji czy delecji w cząsteczkach DNA zazwyczaj badamy za pomocą sekwencjonowania. Aktualnie najpowszechniejszą metodą sekwencjonowania jest sekwencjonowanie przez syntezę, nazywane również sekwencjonowaniem następnej generacji (ang. NGS, *next-generation sequencing*). Ta metoda polega na podziale cząsteczki DNA na krótkie fragmenty, ich jednoczesnym namnożeniu i zsekwencjonowaniu, a następnie odtworzeniu pełnych sekwencji genów. Ta metoda jest dokładna i wydajna, jednak jej wadą jest powstawanie nieściśłości podczas odtwarzania długich regionów DNA z krótkich elementów. Opracowane w 2014 roku nowe podejście – sekwencjonowanie nanoporowe – pozwala na rozszyfrowanie sekwencji DNA w rozmiarach naturalnie występujących. W istocie takiego podejścia leży proces przesuwania DNA przez nanoskopijnych rozmiarów białka – nanopory. Identyfikacja sekwencji DNA odbywa się w trakcie jego przesuwania, na podstawie zmian sygnałów elektrycznych wychodzących z nanoporów. Mechanizm ten pozwala analizować DNA bez fragmentacji: jedyne co musimy zrobić to wyizolować kwas nukleinowy z materiału badanego oraz dołączyć do niego specjalne czynniki, które zainicjują współpracę z nanoporami. W porównaniu z metodą NGS, sekwencjonowanie nanoporowe jest prostsze w wykonaniu. Sekwencjonowanie nanoporowe określa się również mianem sekwencjonowania kolejnej, trzeciej generacji. W dodatku, urządzenie służące do sekwencjonowania DNA za pomocą nanoporów – MinION – jest kieszonkowej wielkości. Przy zastosowaniu metody

nanoporowej otrzymujemy znacząco dłuższe sekwencje wynikowe, które reprezentują części chromosomów i zazwyczaj zawierają co najmniej kilka genów (Rysunek). Taka długość sekwencji nanoporowych pozwala na łatwiejszą identyfikację duplikacji i delecji.



Rysunek. **Identyfikacja duplikacji i delecji za pomocą metod NGS i nanoporowej.** I. - W sytuacji duplikacji genu krótkie sekwencje pasują do referencji tylko w jednym miejscu, gdzie zlokalizowany jest badany gen, a w długich sekwencjach możemy zaobserwować dodatkową kopię genu, często obok oryginalnego. II. - W przypadku delecji genu, odcinki krótkich sekwencji tworzą dopasowania do miejsc w badanym genie, co utrudnia interpretację wyników; mając długie sekwencje, obserwujemy wyraźny brak sekwencji referencyjnej w obrębie sekwencji wynikowej.