

DNA sequencing using electrical conductance measurements of a DNA polymerase

Nature nanotechnology JUNE 2013

Mikk Puustusmaa
Tartu 2013

MIS ON OLEMAS PRAEGU? MIKS VAJA UUT TEHNOLOOGIAT?

- ✓ *RapidTrack Whole Genome Sequencing Service* pakub sekveneerimist teenusena, tulemus vähem kui 2 nädalaga.
 - ✓ 3 µg proov
 - ✓ HiSeq 2500 platvorm
 - ✓ Minimaalne keskmine katvus 30x
 - ✓ SNP calls, insertioonid, deletsioonid jne.
 - ✓ Hind \$9500 /proov või \$7600 kui +50 proovi) (suvi 2012)
 - ✓ Praegu \$5000 /proov ja \$4,000 (50+ samples)

TEISED FIRMAD

- ✓ Centrillion Biosciences, Inc (California)
 - ✓ Kogu genoomi sekveneerimine 3000 \$
- ✓ Axeq Technologies, Inc. (Rockville US only)
 - ✓ 3300 \$ (30-160x kattvusega täisgenoom)
 - ✓ Eksoom 30x 650\$ /proov
 - ✓ Eksoom 50x 850\$/proov

MILLINE PEAB OLEMA 3 PVK?

Kolmanda põlvkonna sekveneerimine ehk **ühe molekuli sekveneerimine**.

OMADUSED:

- ✓ ei vaja amplifikatsiooni ega nukleotiidide märgistamist
- ✓ ei kasutata kloonimist ega ligeerimist
- ✓ lugemite pikkus üle 1000pb
- ✓ olematu vigade arv
- ✓ odav

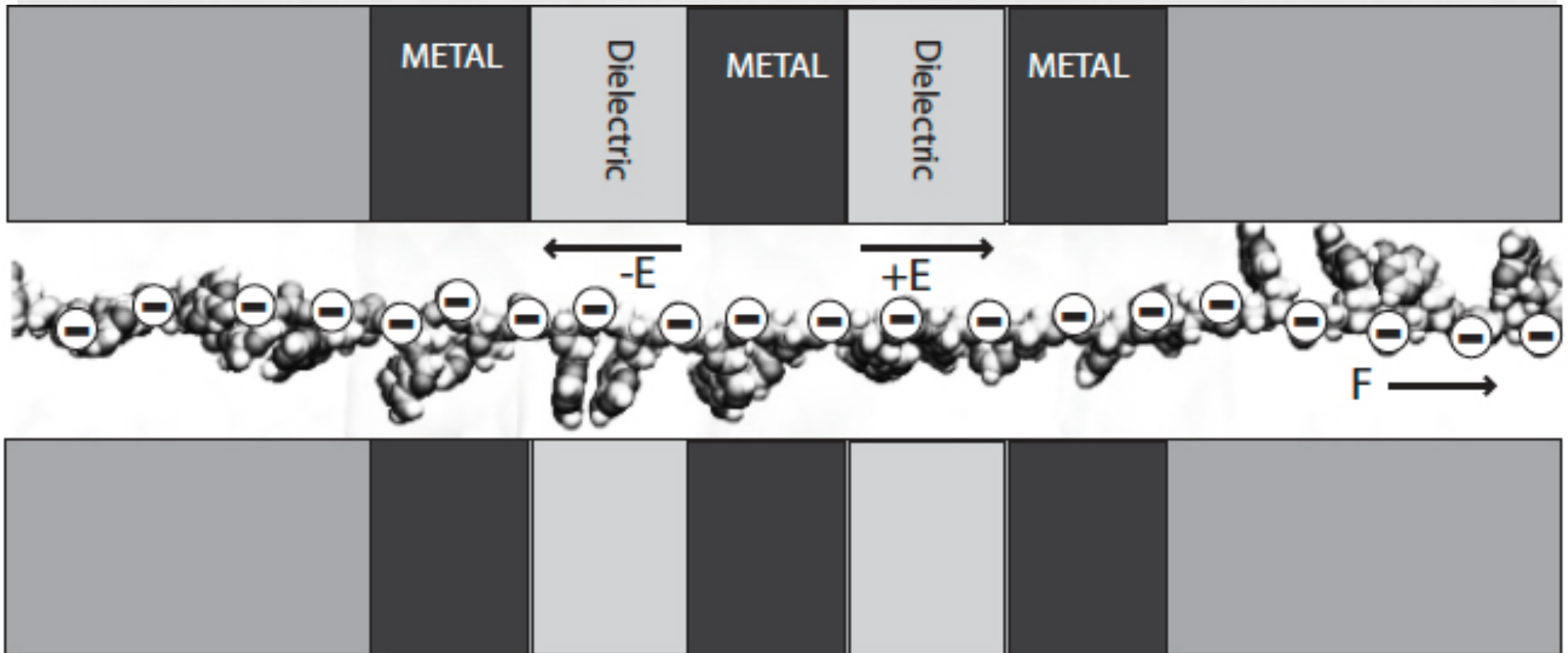
TEHNOLOOGIAD

- *Nanopoor DNA sekveneerimine*
- SBS (sequence by synthesis) tehnoloogia,
- *Tunnelling currents DNA sekveneerimine*
- *Sekveneerimine kasutades hübridisatsiooni*
- Sekveneerimine mass-spektromeetriaga
- Microfluidic Sanger sekveneerimine
- Mikroskoopial baseeruvad tehnikad
- RNAP sekveneerimine

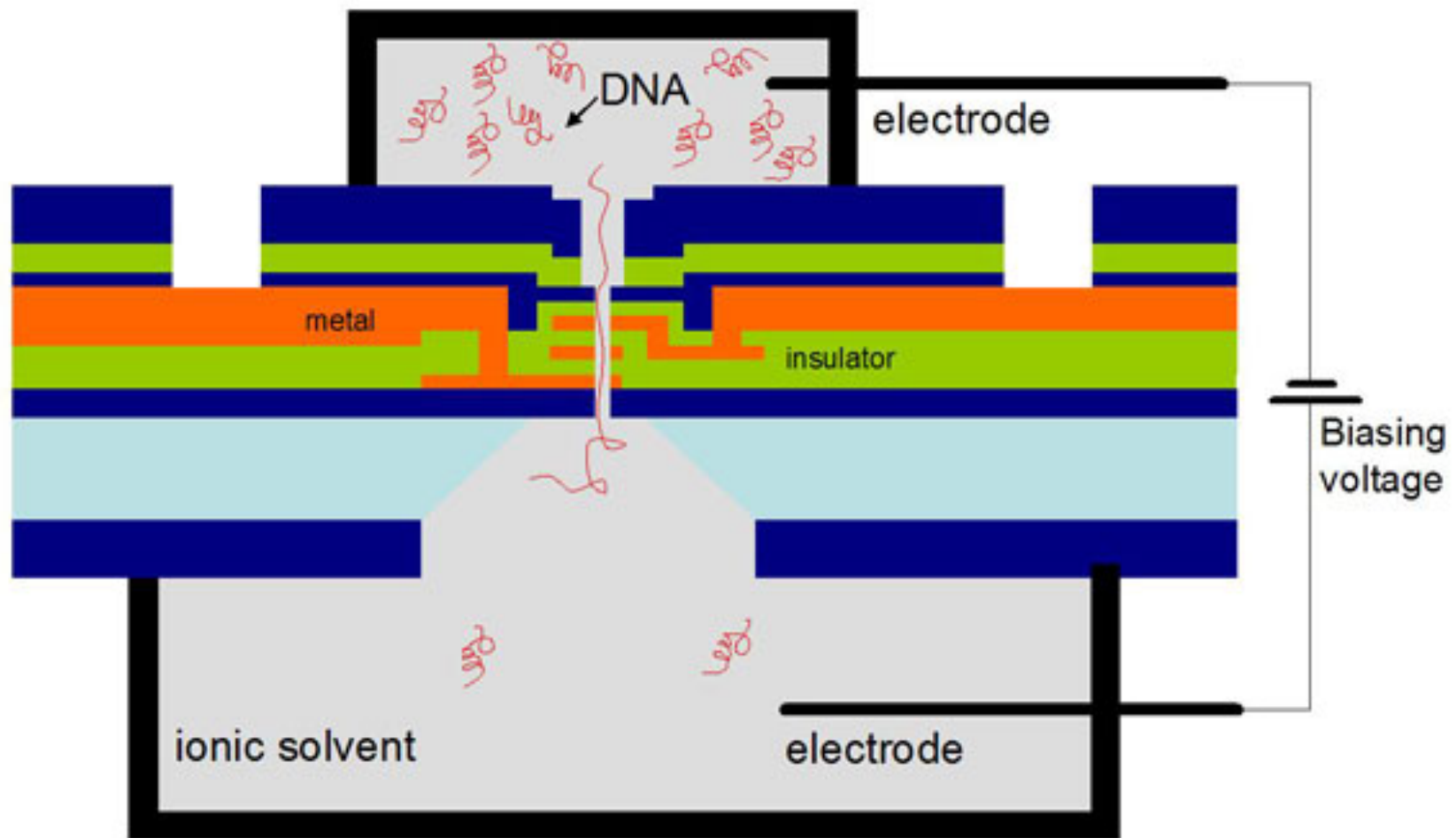
IBM DNA TRANSISTOR

- Watson Research Lab Gustavo Stolovitzky (genomics) ja Stanislav Polonsky (IBM pooljuhid, füüsika) (New York in 2007)
- DNA liigub läbi nanopoori mitu miljonit aluspaari sekundis.
- Antud tehnoloogia lubab püüda DNA elektrivälja lõksu ning liigutada edasi 1 nukleotiidi kaupa
- Juulis 2010 alustasid Roche ja IBM koostööd

IBM DNA TRANSISTOR



IBM DNA TRANSISTOR



OXFORD NANOPORE TECHNOLOGIES

- Inimese genoom sekveneeritakse 15 minutiga
- Hind pidi jääma alla \$900
- MinION – USB (10kb lugem)
- £40 million 9. okt



ARTIKKEL

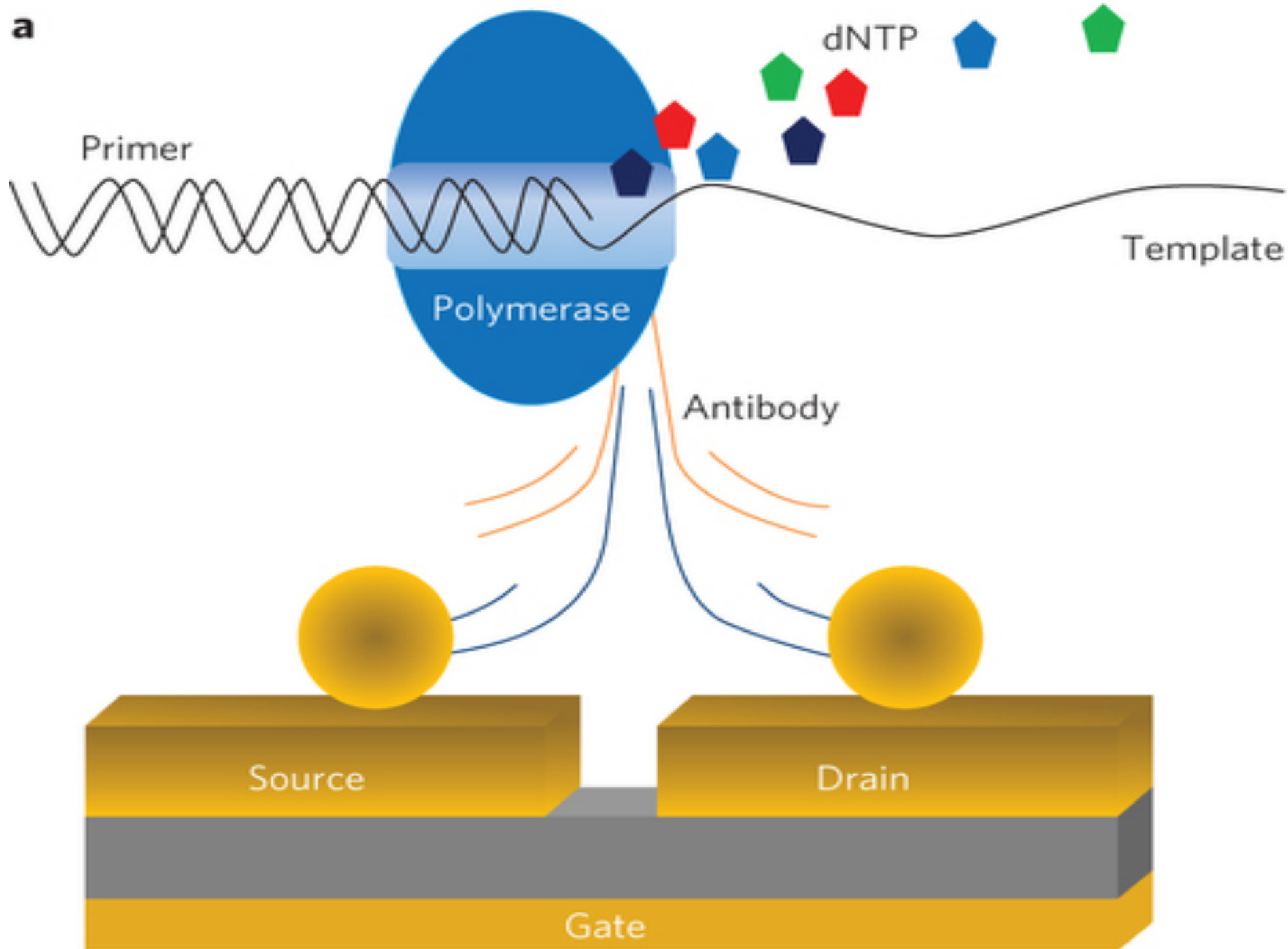
Autorite eesmärk oli luua tehnoloogia ühe molekuli sekveneerimiseks, kaustades selleks DNA polümeraasi elektrijuhtivust.

SISU

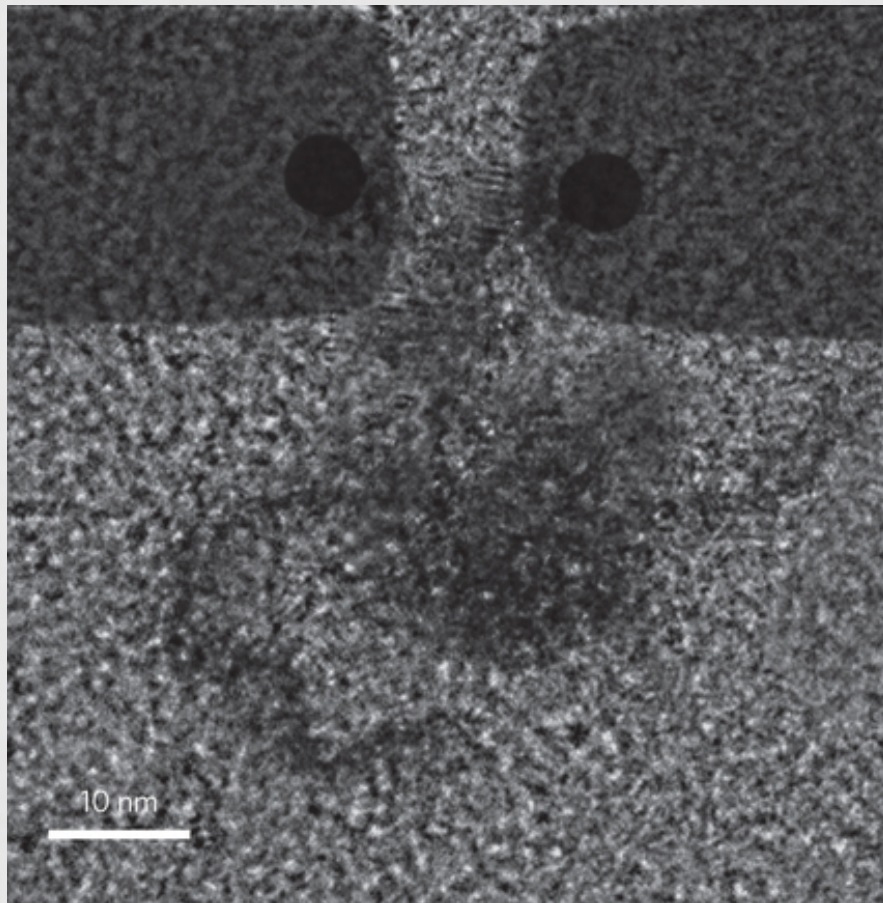
- Mittekovalentsed interaktsioonid substraadi (dNTP) ja ensüümi (DNApol) vahel muudavad kogu süsteemi elektrijuhtivust.
- Rühm lõi valgutransistori, mis on võimeline hoidma DNApolümeraasi ning mõõtma elektrijuhtivust, kui sünteesitakse uus ahel.

VALMISTAMINE

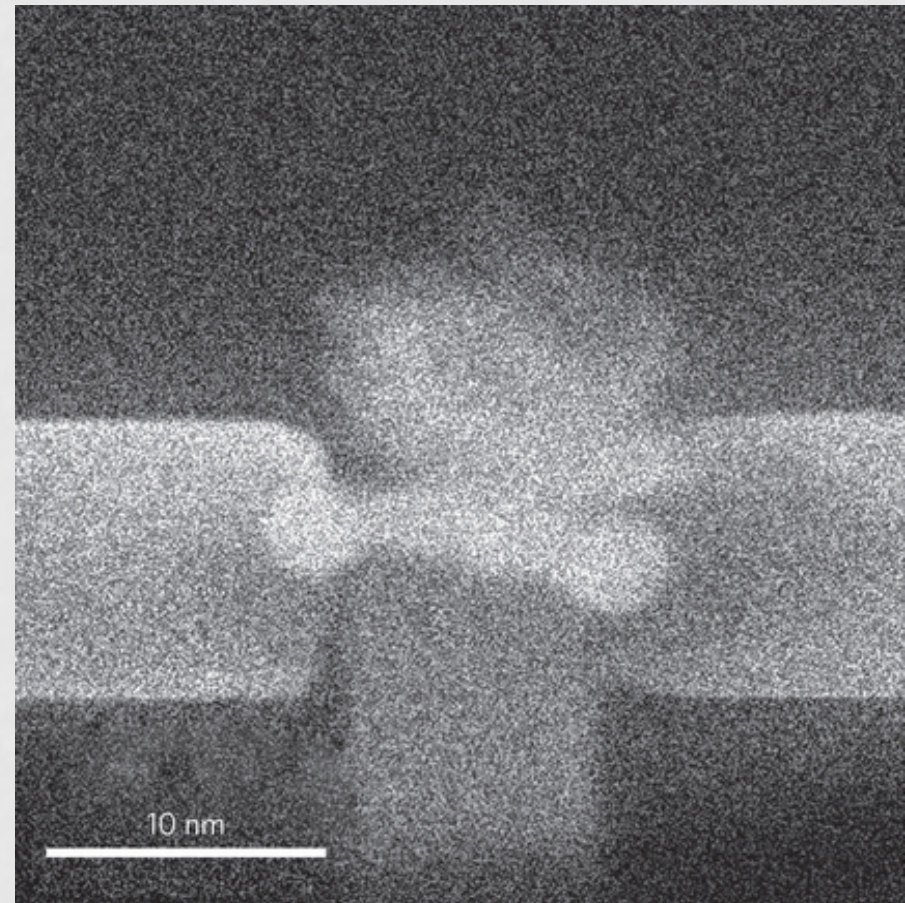
- 50nm laiuse elektroodi tehti 10nm lõhe elektronkiire litograafiaga.
- 5nm kulla nanoosakesed paigutati elektroodile kasutades - *atomic force microscope*
- *Järgnevalt kaeti süsteem polüdimetüüsiloksaaniga – kaitsta füüsiliste kahjustuste eest.*
- IgG lisati konsentratsioonis 1pg/ml



VALGUTRANSISTOR



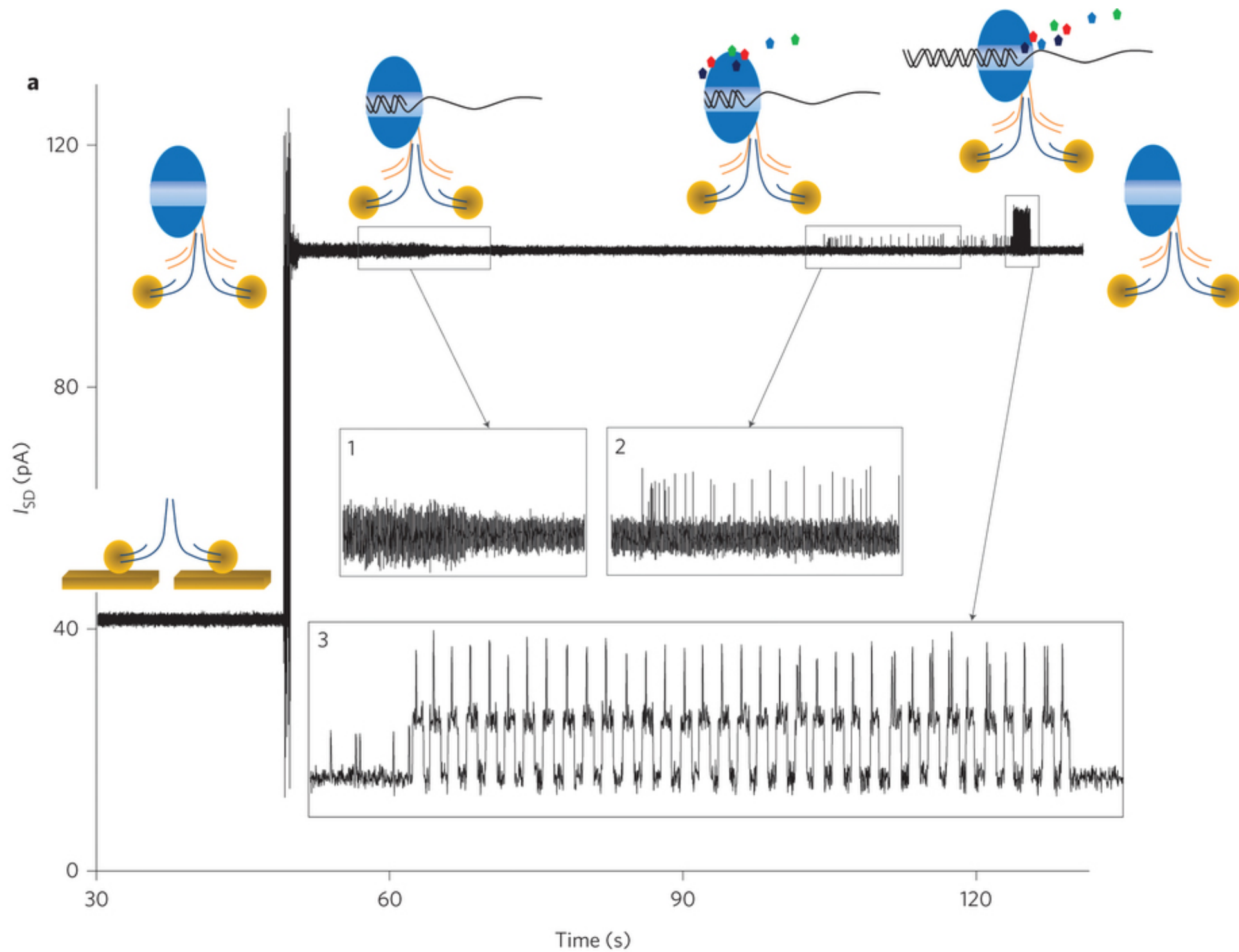
Transmission electron microscopy

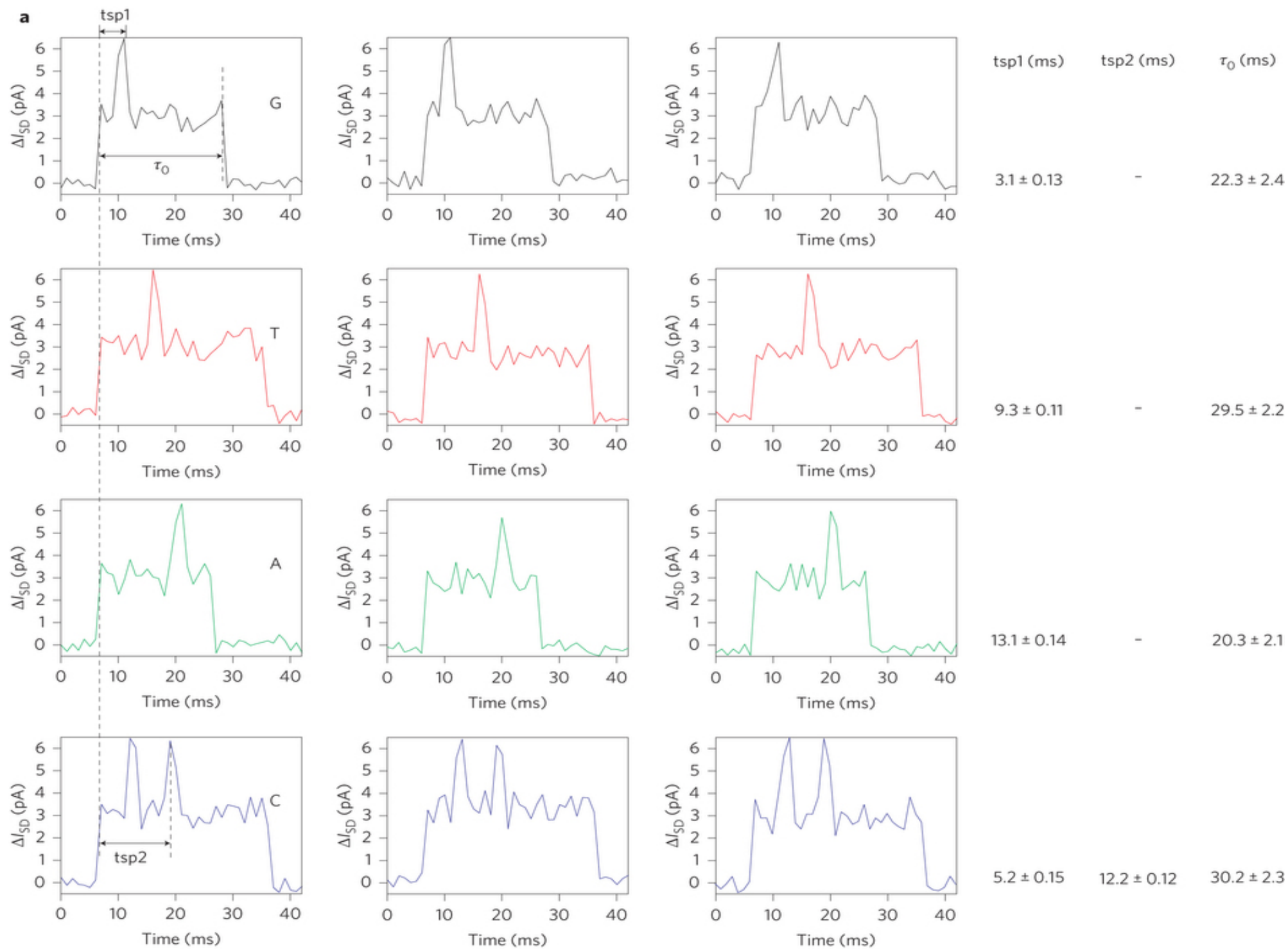


Scanning electron microscopy

POLÜMERAAS

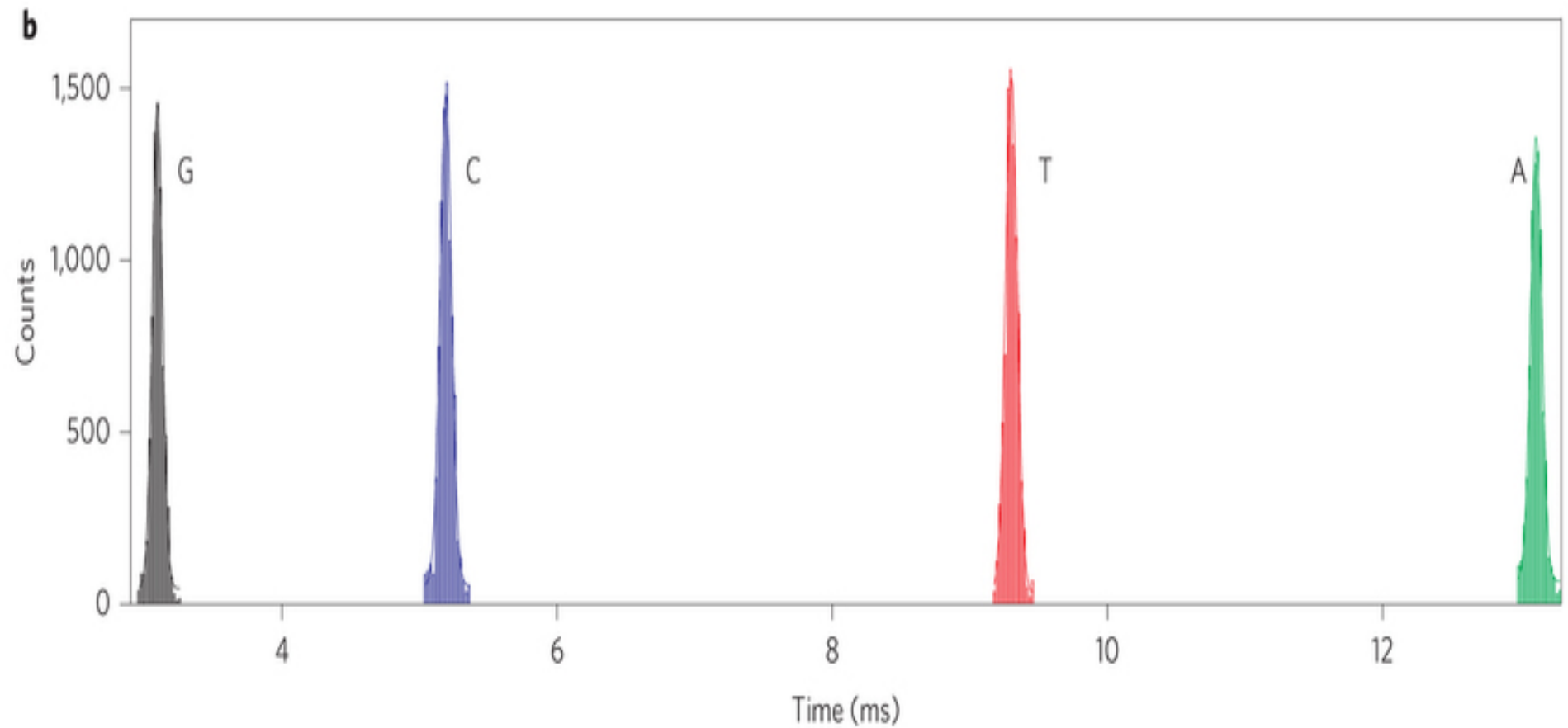
- Phi29
- Monomeerne
- Kõrge protsessiivsus (üle 10kb fragmendid)
- Proofreading aktiivsus- madal vigade arv





TULEMUS

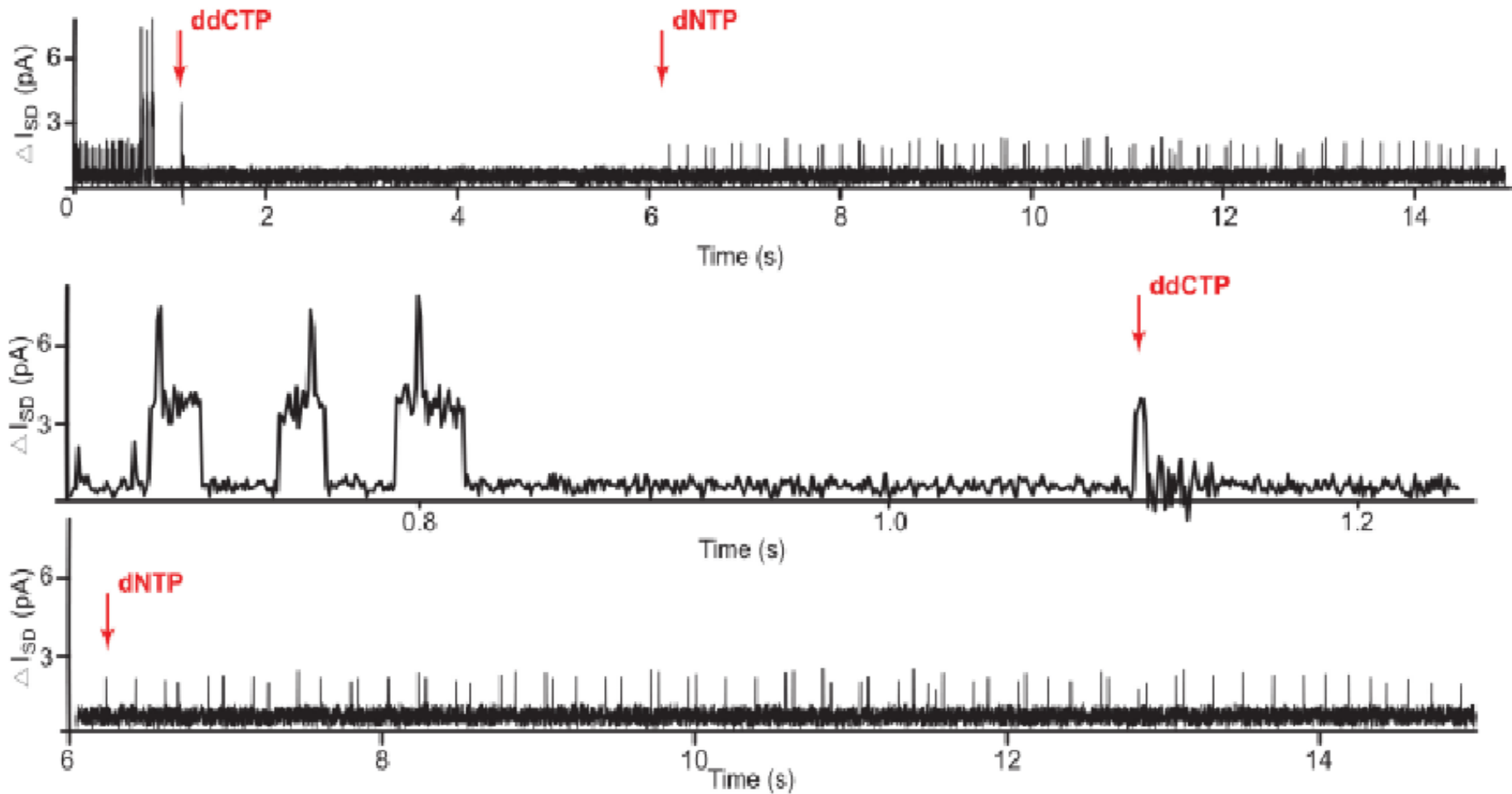
- Algandmetest valitud 50 000 juhuslikku platoo piiki



TULEMUS

- Suhteliselt väikse varieeruvusega platoode pikkus ja tippude jaotus näitab, et polümeraasi katalüütiline aktiivsus on konstantne (katalüüs toimub kindlat rada mööda) ja mitte stohhastiline (juhuslik).
- Kui lisati ddNTP-sid saadi ainult seondumistipud graafikul, kuid mitte reaktsiooni platood

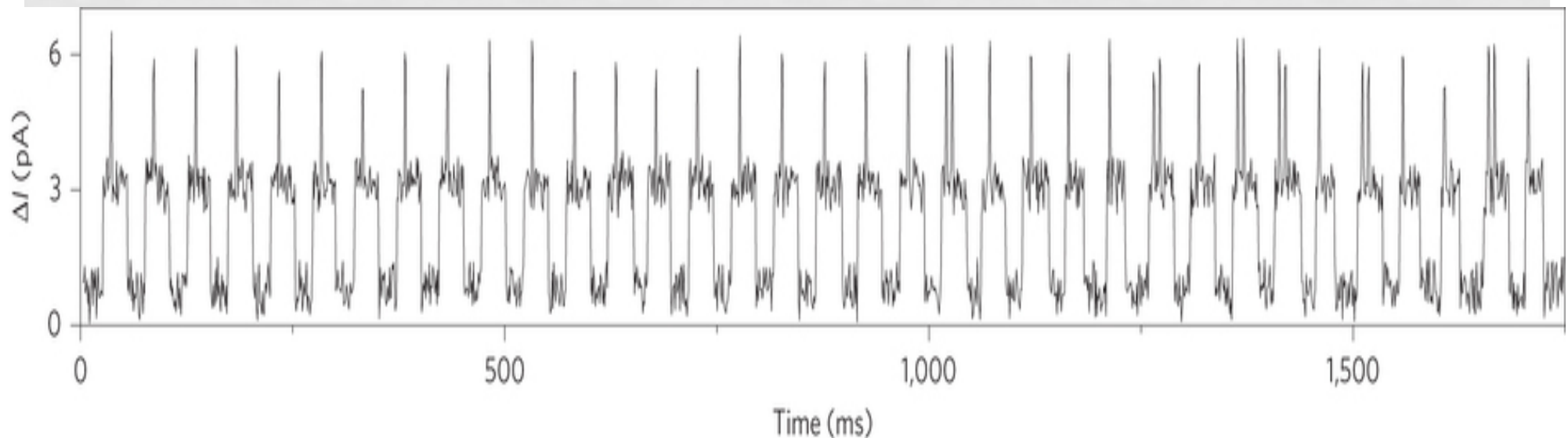
SUPPLEMENTARY



Kui reaktsioon oli peatatud ddNTP-ga ja hiljem lisati dNTP oli näha seondumise piike, aga ei teki reaktsiooni platood

KORDUSJÄRJESTUSED

- Kordusjärjestused probleemseks alaks, antud katses prooviti sekveneerida 20 T nukleotiidi järjest
- (5' → 3') (t)₂₀cttggctccgaggcg



Võimeline vigadeta lugeda 20 T nukleotiidi järjestikku

ERINEVAD POLÜMERAASID

Table 1: Heights and widths of the plateaux sequenced by various polymerases.

	Hr* (pA)				τ_0 (ms)			
	G	T	A	C	G	T	A	C
$\Phi 29^\dagger$	3.1 ± 0.41	3.01 ± 0.41	3.0 ± 0.43	3.1 ± 0.42	22.3 ± 2.4	29.5 ± 2.2	20.3 ± 2.1	30.2 ± 2.3
T4	3.2 ± 0.42	3.2 ± 0.58	3.1 ± 0.43	3.3 ± 0.54	22.2 ± 2.5	29.2 ± 2.4	20.1 ± 2.3	30.5 ± 2.3
T7	3.3 ± 0.42	3.6 ± 0.43	3.1 ± 0.4	3.7 ± 0.41	23.1 ± 2.3	26.4 ± 2.3	19.2 ± 2.1	28.3 ± 2.2
Poll	3.4 ± 0.8	3.7 ± 0.68	3.2 ± 0.72	3.8 ± 0.67	20.1 ± 2.4	25.4 ± 2.4	26.2 ± 2.3	33.2 ± 2.6

TULEMUS

- Molekulaarsed mehhanismid, nukleotiidide aluspaardumine ning fosfodiesterideme moodustumine – kõik need protsessid toimuvad sarnaselt polümeraasides.
- Phi29, T4 ja T7 kõik osutusid väga headeks kandidaatideks antud tehnoloogia juures.

TEADMATA

- Täpselt ei ole teada veel:
 - Vigade arv
 - Kuigi ühe oligo (nr3) 20 kordsel sekveneerimisel 4 erineva polümeraasi poolt ehk 50 000 nukleotiidi sekveneerimisel ei leitud ühtegi viga.
 - järjestuste pikkus, mida suudetakse lugeda
 - Ensüümi ja dsDNA kompleksi kasvav füüsiline suurus ning mass võivad muuta juhtivust või müra suurendada
 - Rakkudes leiduv bioloogiline vedelik võib tekitada liigset müra ning antud tehnoloogia ei pruugi olla kasutatav *in vivo single-cell*

TÄNÄN KUULAMAST