



# BEVEZETÉS A BIOINFORMATIKÁBA

## DNS VIZSGÁLATOK

KOZLOVSZKY MIKLÓS

KOZLOVSZKY.MIKLOS@NIK.UNI-OBUDA.HU

7.A ELŐADÁS

# DNS VIZSGÁLATI MÓDSZEREK

- Célja:
  - Betegségeket okozó mutációk felderítése
  - Genetikai rizikófaktorok megismerése
  - Farmakogenetika (gyógyszeres kezelésre adott válasz)
  - Prenatális vizsgálat (pl. NIPT- non-invasive prenatal testing)
  - Apasági vizsgálatok
  - Igazságügyi vizsgálatok
- Kutatás vs diagnosztika

# POLIMERÁZ LÁNCREAKCIÓ

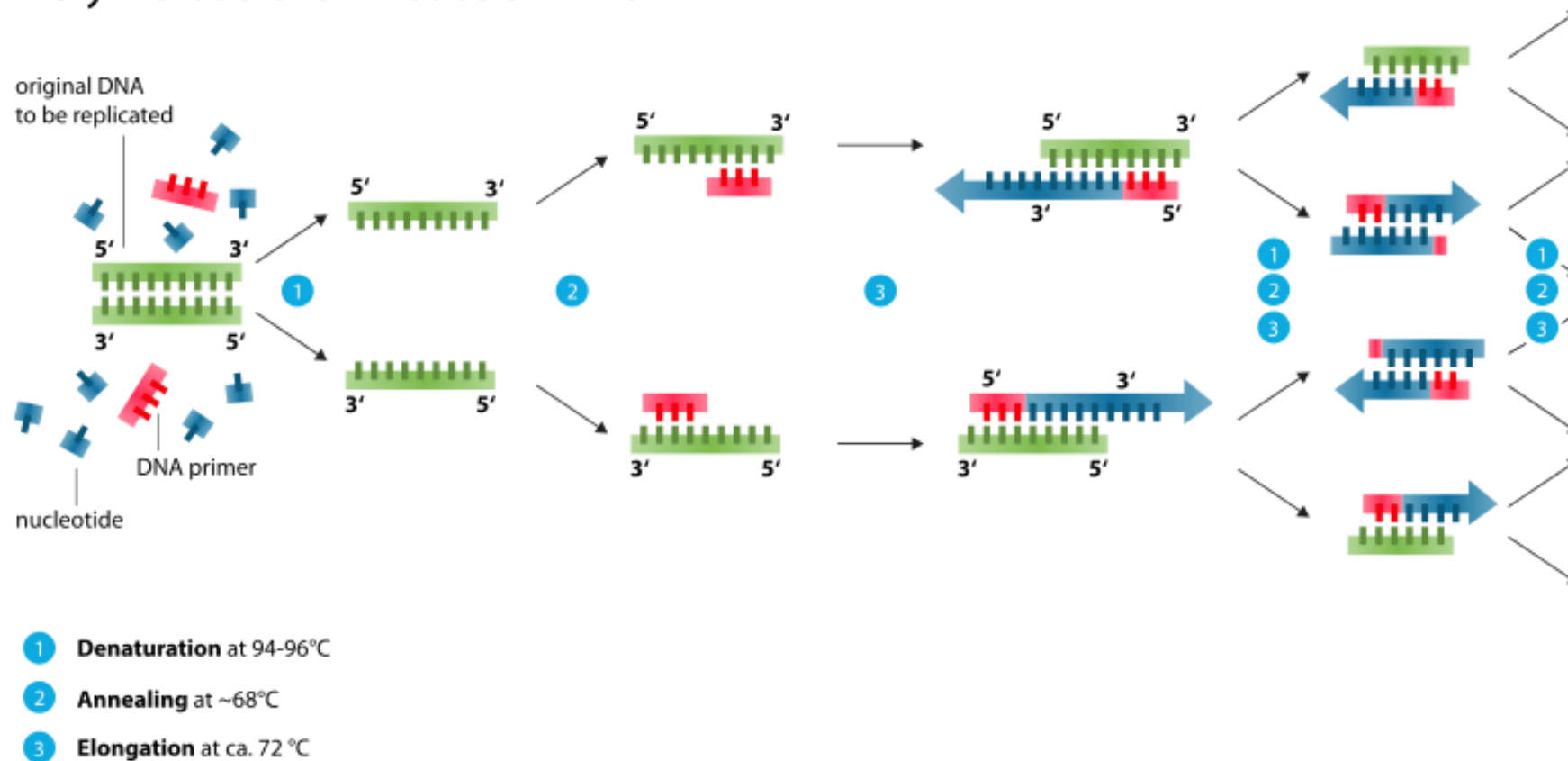
## POLYMERASE CHAIN REACTION = PCR

- DNS-replikáció kémcsőben is elvégezhető → PCR
- Kary Mullis 1993 kémiai Nobel-díj
- DNS felszaporítására használt alap molekuláris biológiai módszer
- Amplifikáció = felsokszorozás
- Szükséges hozzá:
  - *DNS-templát* – felszaporítanivaló DNS-szakasz
  - *Két primer* – kijelöli az amplifikálandó szakasz elejét és végét
  - *DNS-polimeráz* – enzim, amely „másol”
  - *Nukleotid építőkövek* – az új DNS alapja
  - *Puffer* – amely biztosítja a DNS-polimeráz számára megfelelő kémiai környezetet

# POLIMERÁZ LÁNCREAKCIÓ

## POLYMERASE CHAIN REACTION = PCR

### Polymerase chain reaction - PCR

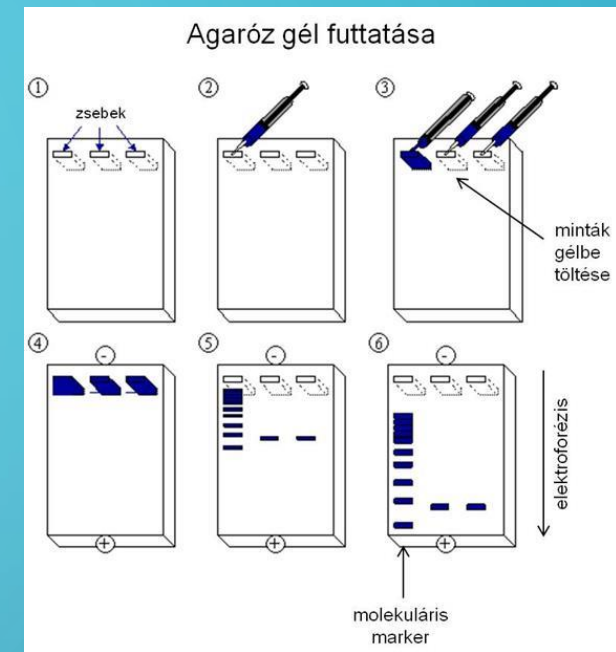


Kép forrása: [https://en.wikipedia.org/wiki/Polymerase\\_chain\\_reaction](https://en.wikipedia.org/wiki/Polymerase_chain_reaction)

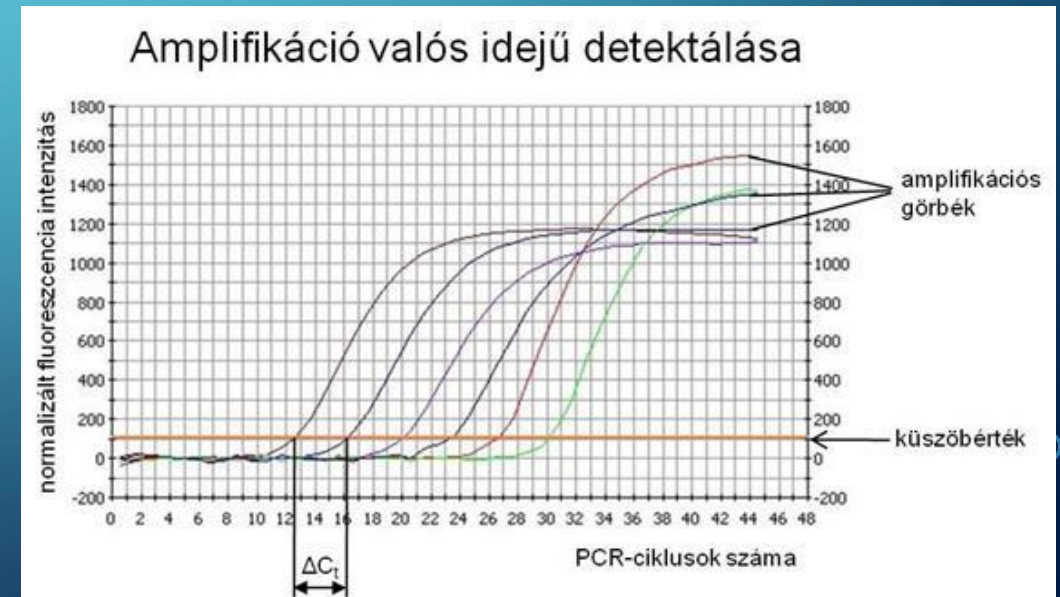
<https://www.youtube.com/watch?v=uKeMiAZ8Zu4>

# PCR DETEKCIÓS MÓDSZEREI

- Végpont detekció: a felszaporított terméket vizualizáljuk gél elektroforézis használatával
- Valós idejű PCR (RT-PCR): a reakcióhoz adott fluoreszcens festékeket adunk, amelyek beépülnek a DNS-be, ennek segítségével detektáljuk a reakciót valós időben



[https://regi.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop412A/2011\\_0079\\_wunderlich\\_molbio/ch03s04.html](https://regi.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop412A/2011_0079_wunderlich_molbio/ch03s04.html)



[https://regi.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop412A/2011\\_0079\\_wunderlich\\_molbio/ch07s12.html](https://regi.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop412A/2011_0079_wunderlich_molbio/ch07s12.html)

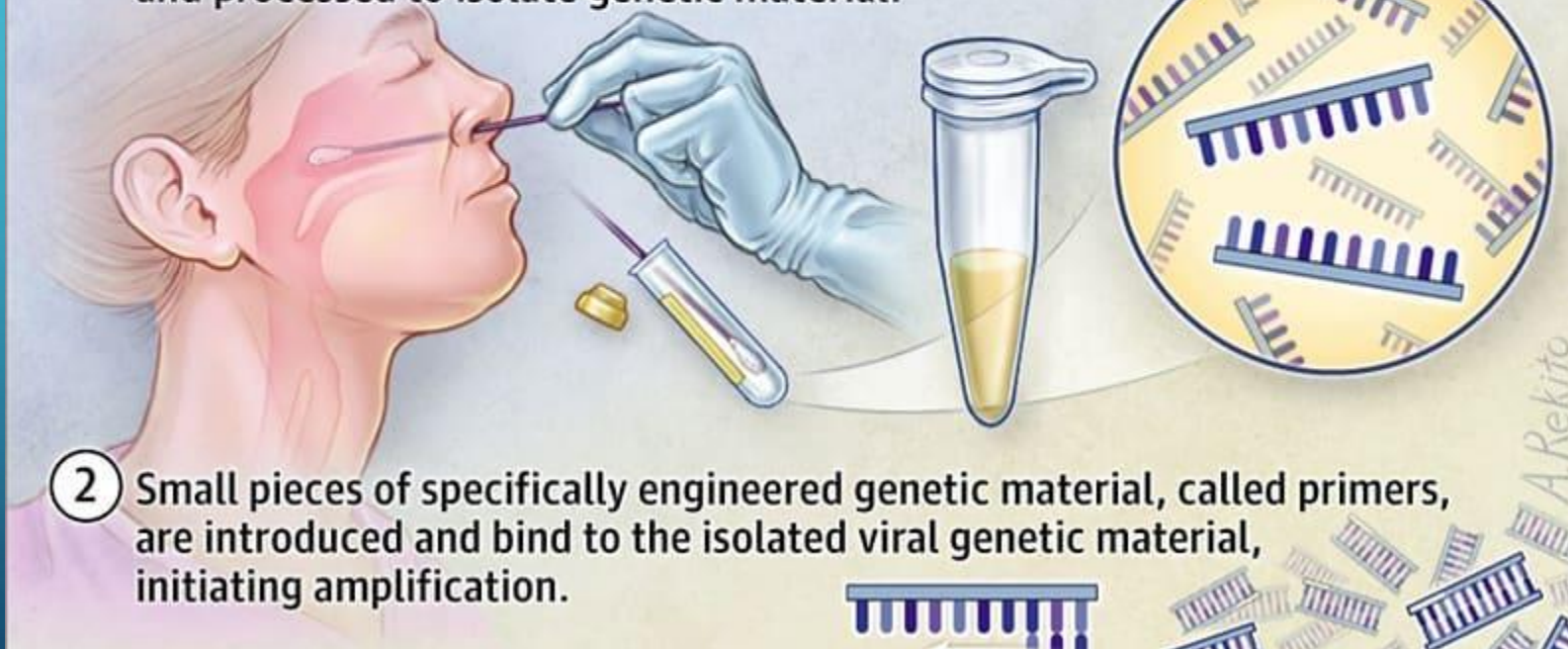


# PCR GYAKORLATI ALKALMAZÁSA

## How does PCR testing for COVID-19 work?

Polymerase chain reaction (PCR) testing can detect even very small amounts of viral genetic material in a sample by duplicating it many times over through a complex laboratory process called amplification.

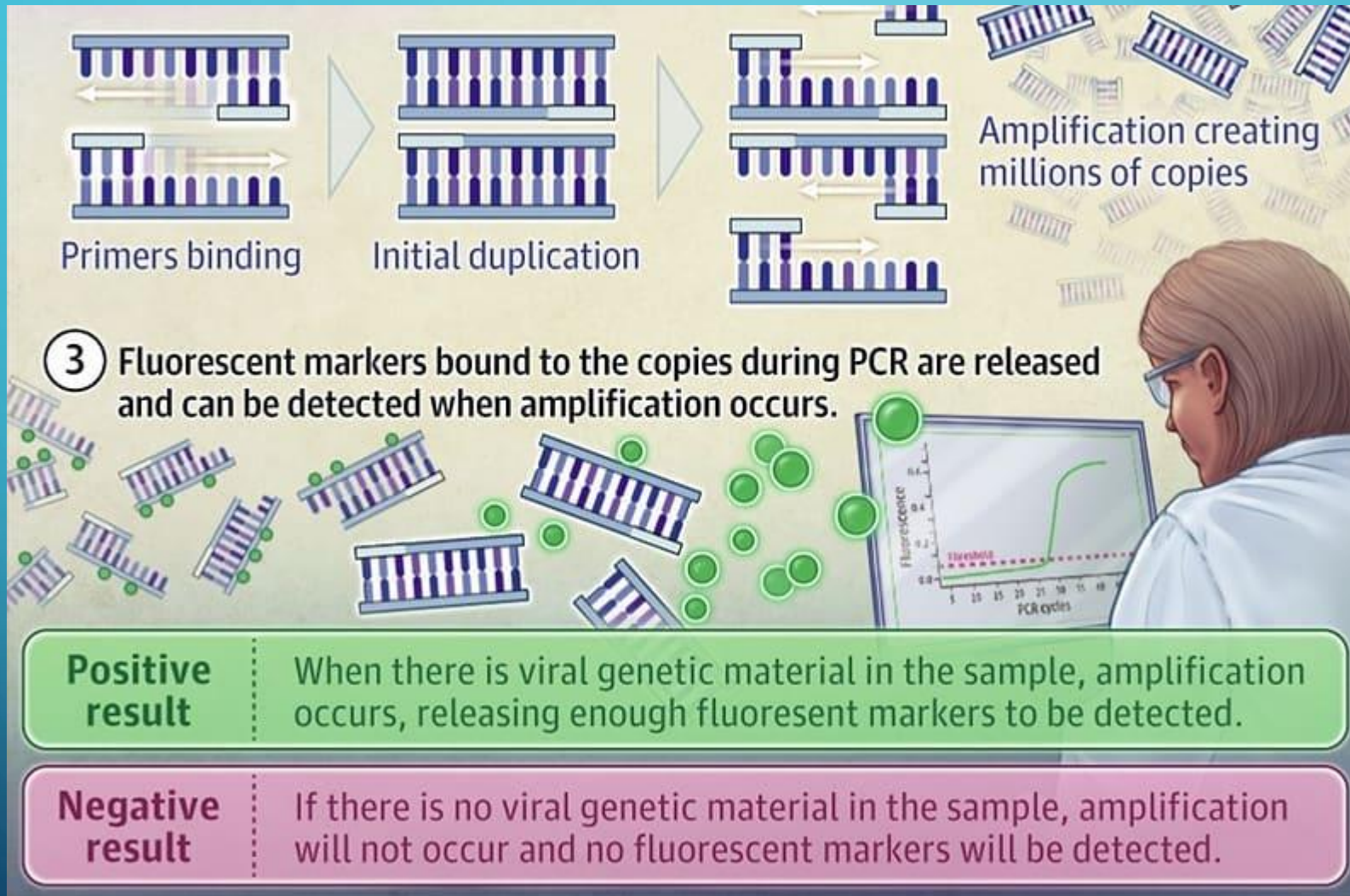
- 1 A test sample is swabbed from the back of the nose and processed to isolate genetic material.



- 2 Small pieces of specifically engineered genetic material, called primers, are introduced and bind to the isolated viral genetic material, initiating amplification.

[https://twitter.com/JAMA\\_current/status/1245766893811765249/photo/2](https://twitter.com/JAMA_current/status/1245766893811765249/photo/2)

# PCR GYAKORLATI ALKALMAZÁSA



[https://twitter.com/JAMA\\_current/status/1245766893811765249/photo/2](https://twitter.com/JAMA_current/status/1245766893811765249/photo/2)

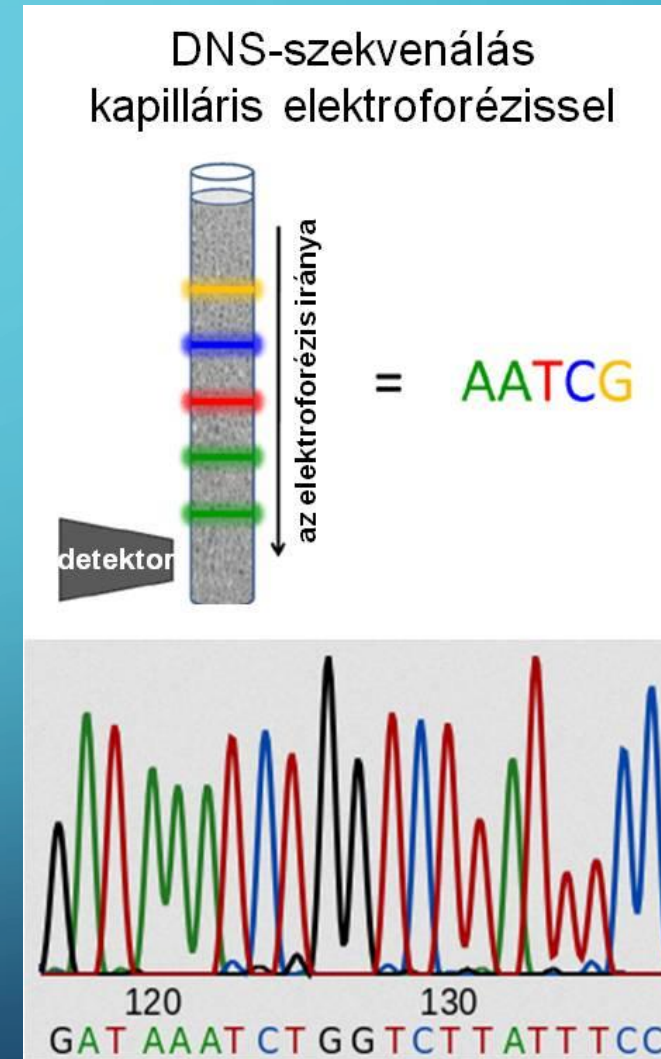
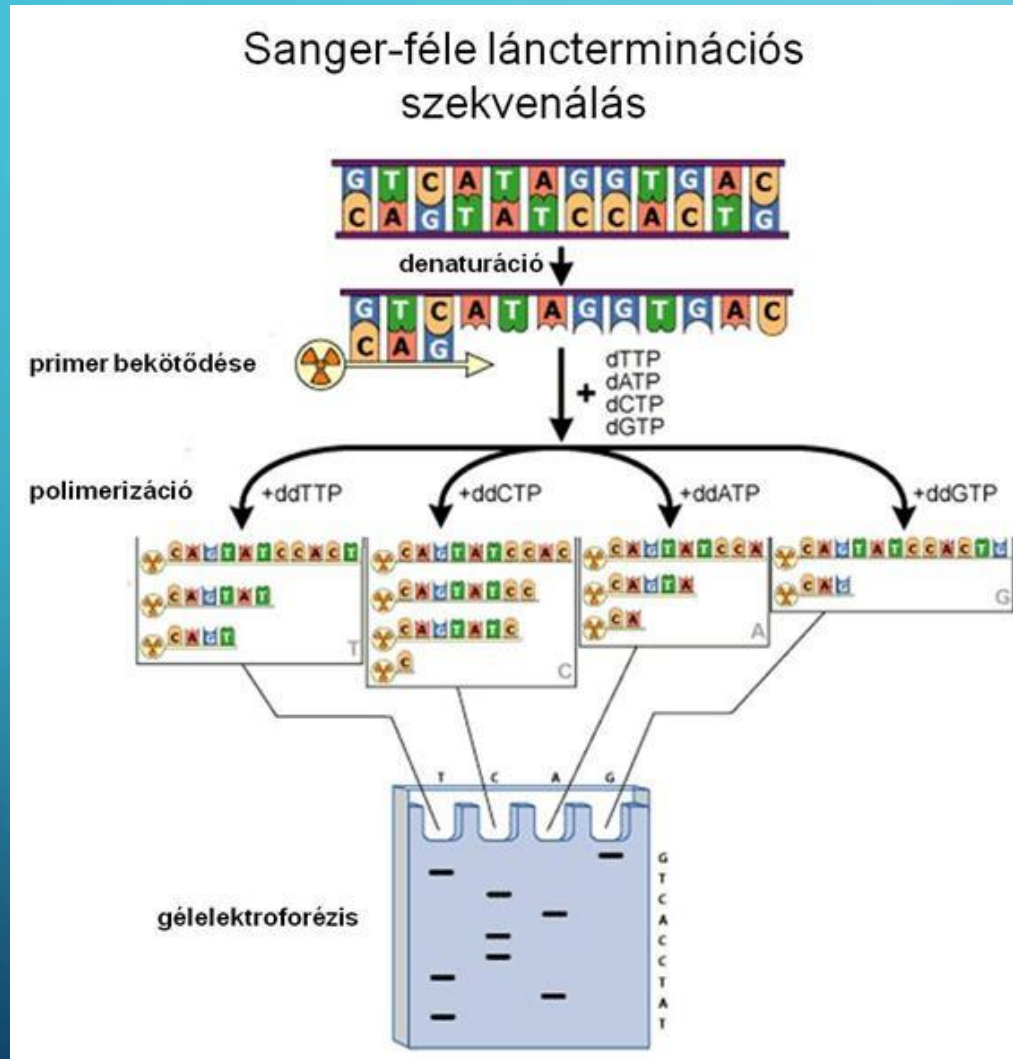


# SZEKVENÁLÁS

- Célja: a DNS bázissorendjének meghatározása
- Elsőgenerációs szekvenálás: **Sanger féle láncterminációs módszer**
- ddNTP, jelölés radioaktív vagy fluoreszcens is lehet
- A minta csak ismert szekvencia lehet
- Mai napig használt technológia
- Előnye: pontos
- Hátránya: lassú



# SANGER FÉLE LÁNCTERMINÁCIÓS MÓDSZER



[https://regi.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop412A/2011\\_0079\\_wunderlich\\_molbio/ch08.html](https://regi.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop412A/2011_0079_wunderlich_molbio/ch08.html)

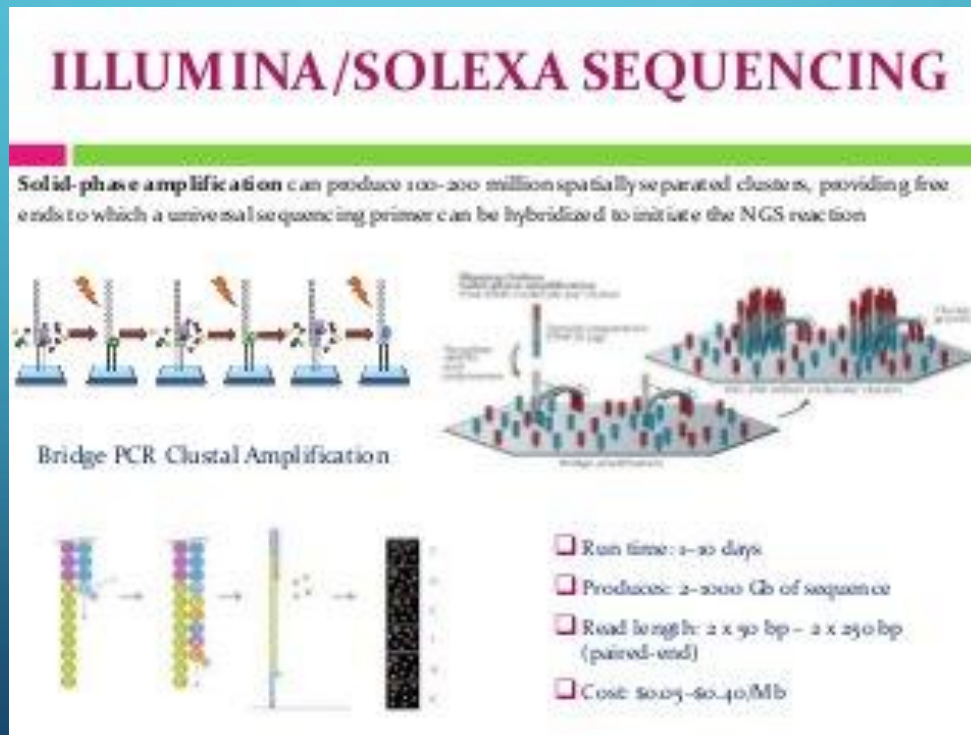
<https://www.austincc.edu/mlt/mdfund/pictures/sequencing1.gif>

# NGS = NEXT GENERATION SEQUENCING

Kb 2005-től fejlesztett, nagy áteresztőképességű módszerek

Gyors (HUGO: évek vs NGS: napok/órák)

Több millió DNS szál szekvenálása egyidejűleg



Sanger szekvenálás	NGS
max 1000bp (általában 5-600 bp)	Több millió bp párhuzamos szekvenálása
kis kapacitás, egyszerre 1 minta	Multiplexálható – több minta egyszerre
Relatív drága	Relatív olcsóbb
lassú	gyors
Nagy pontosság	Jól automatizálható

# NGS MEGKÖZELÍTÉSEK

A szekvenált tartalom szerint:

- Teljes genom
- Teljes exom
- Teljes transzkriptóm
- Panel szekvenálás - előre kiválasztott, rövidebb szakaszok összessége

Technikailag:

- Hybrid capture alapú = a vizsgálni kívánt DNS szakaszok kihorgászása
- Amplikon alapú = a vizsgálni kívánt DNS szakaszok PCR felsokszorozása



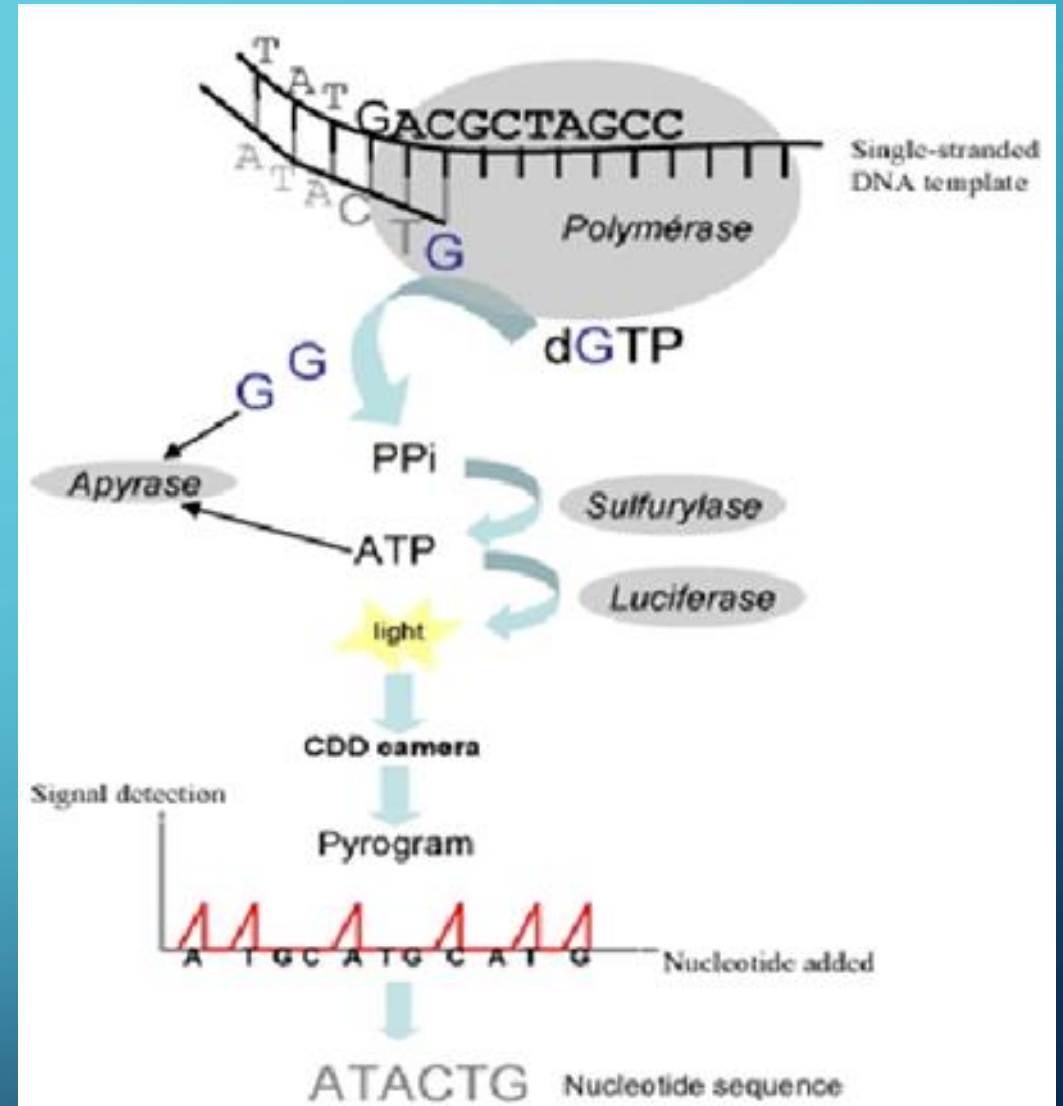
# NGS FOLYAMATA

könyvtérkészítés

- 1, DNS fragmentálása: a DNS mintát meghatározott méretű darabokra hasítjuk
  - Enzimátikus
  - Fizikia (pl. ultrahang)
- 2, Adapter szekvenciákat adunk a DNS minták végeihez  
ligálás, PCR
- 3, Index szekvenciákat adunk a DNS mintákhoz – mintára/páciensre specifikus
- 4, Minták= könyvtárak felszaporítása (emulziós PCR olajcseppekben vagy ún. bridge amplifikáció)
- 5, Tisztítás, minőségi és mennyiségi ellenőrző lépések
- 6, NGS szekvenálás

# PIROSZEKVENÁLÁS

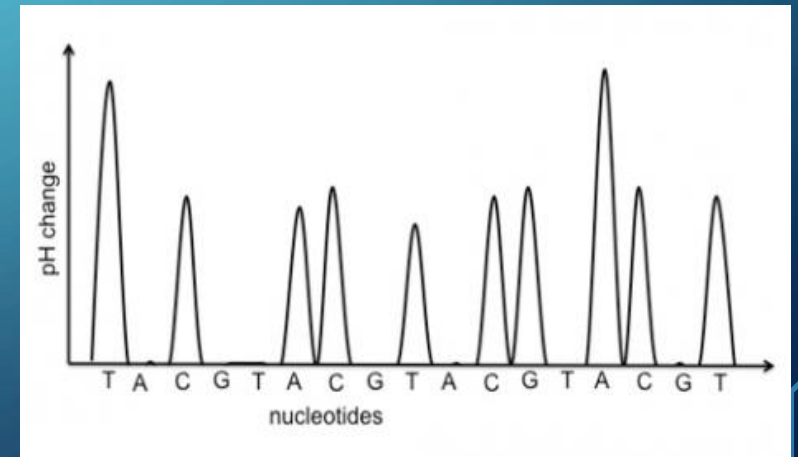
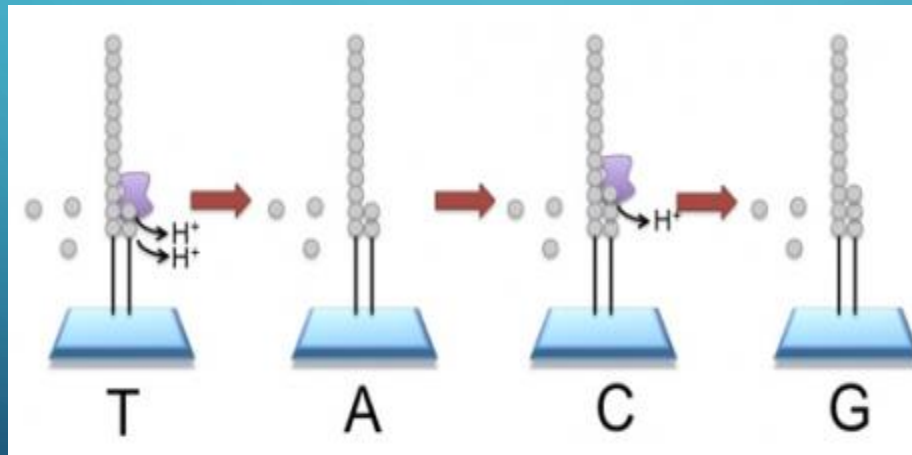
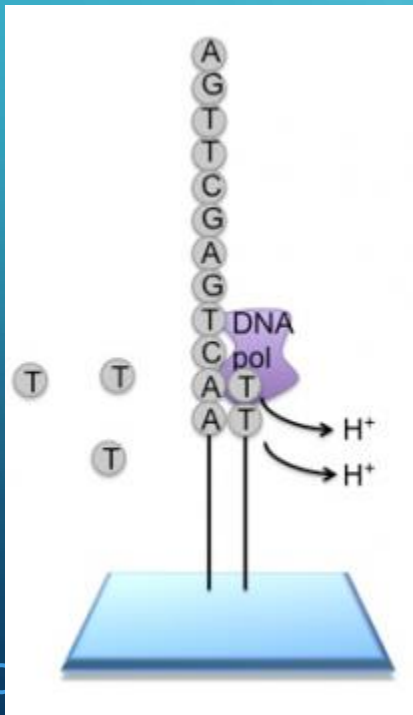
- Alapja: a DNS szintézis közben beépülő nukleotidról leszakadó pirofoszfát csoport detektálása enzimek segítségével, fényfelvillanás detektálással
- A reakcióhoz adott nukleotidok sorrendje ismert, a komplementer szál szerint beépülő nukleotidsorrendet határozzuk meg
- A fényjelek intenzitása a beépült nukleotidok számával arányos (kb 5 nukleotidig)
- Hátránya: relatív rövid szakaszok leolvasására alkalmas



[https://regi.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop412A/2011\\_0079\\_antal\\_bioinformatika/ar01.html](https://regi.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop412A/2011_0079_antal_bioinformatika/ar01.html)

# ION TORRENT SZEKVENÁLÁS

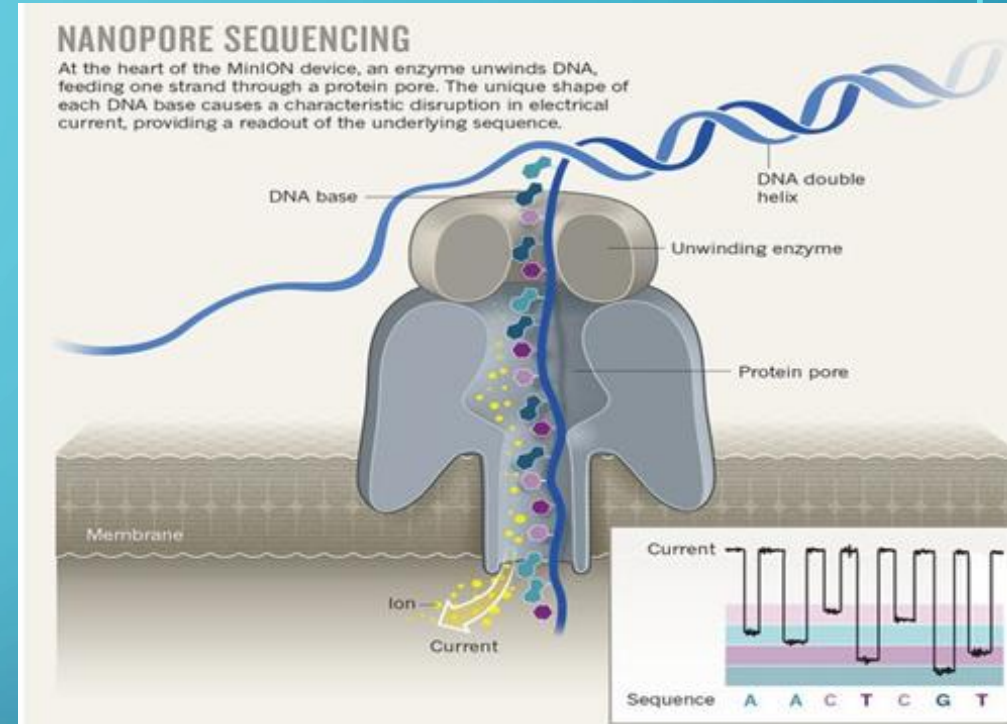
- Alapja: közvetlenül a nukleotid beépülésénél felszabadult hidrogénatom töltését regisztrálják
- Nincs fluoreszcens jelölés
- Előny: gyors, relatív olcsó



<https://www.ebi.ac.uk/training/online/course/ebi-next-generation-sequencing-practical-course/what-next-generation-dna-sequencing/ion-torre>

# NANOPORE SZEKVENÁLÁS

- Kis méretű hardver (USB stick)
- Ez a folyamat nem igényel amplifikációt
- DNS-t egy membránon lévő kb. 1 nanométer átmérőjű póruson átvezetik elektroforézissel,
- ahogy az egyes bázisok áthaladnak a membrán-pórus komplexen, megváltoztatják a pórus elektromos potenciálját
- Ezt a fluktuációt méri a detektor → DNS szekvencia



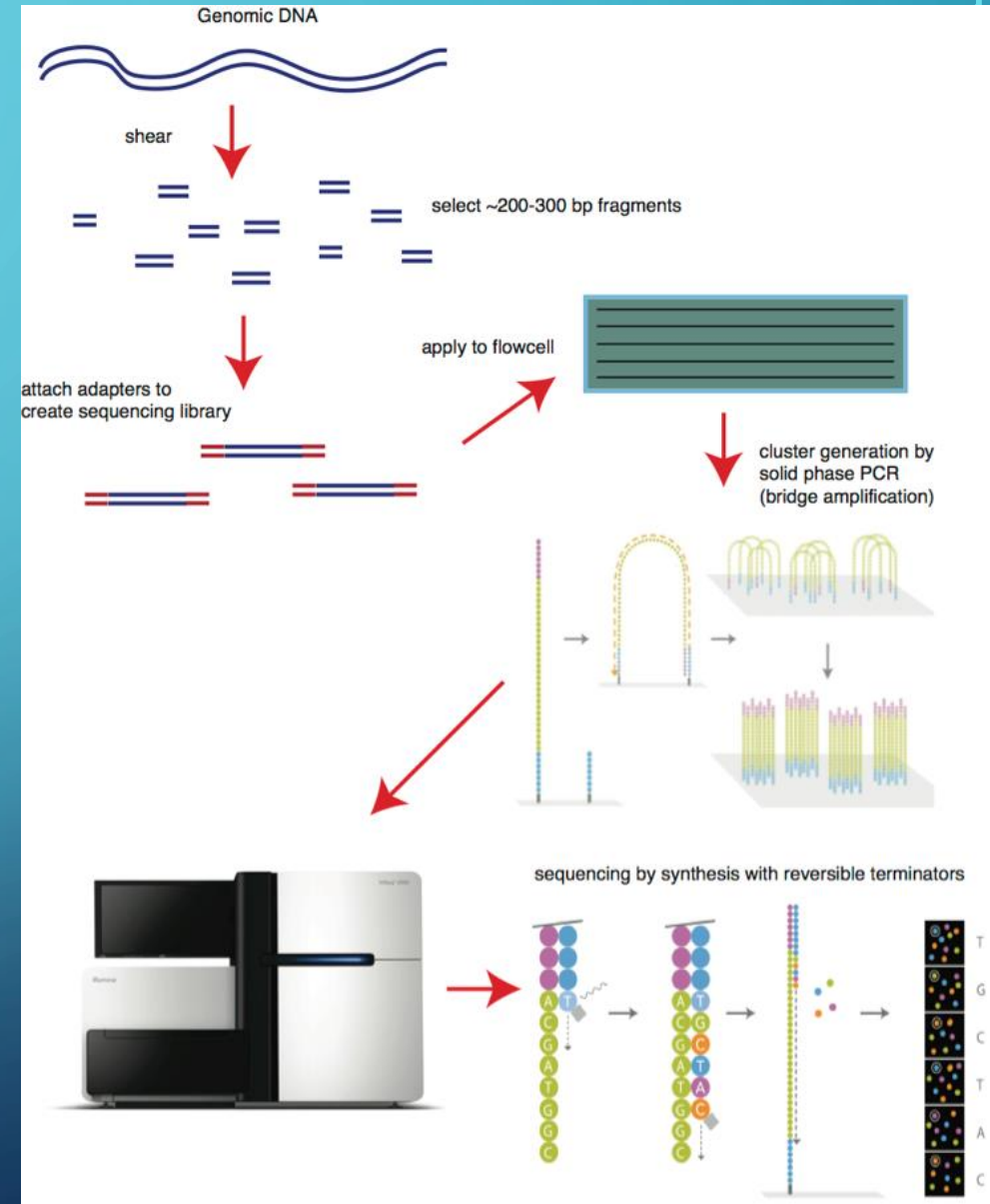


# ILLUMINA SZEKVENÁLÁS

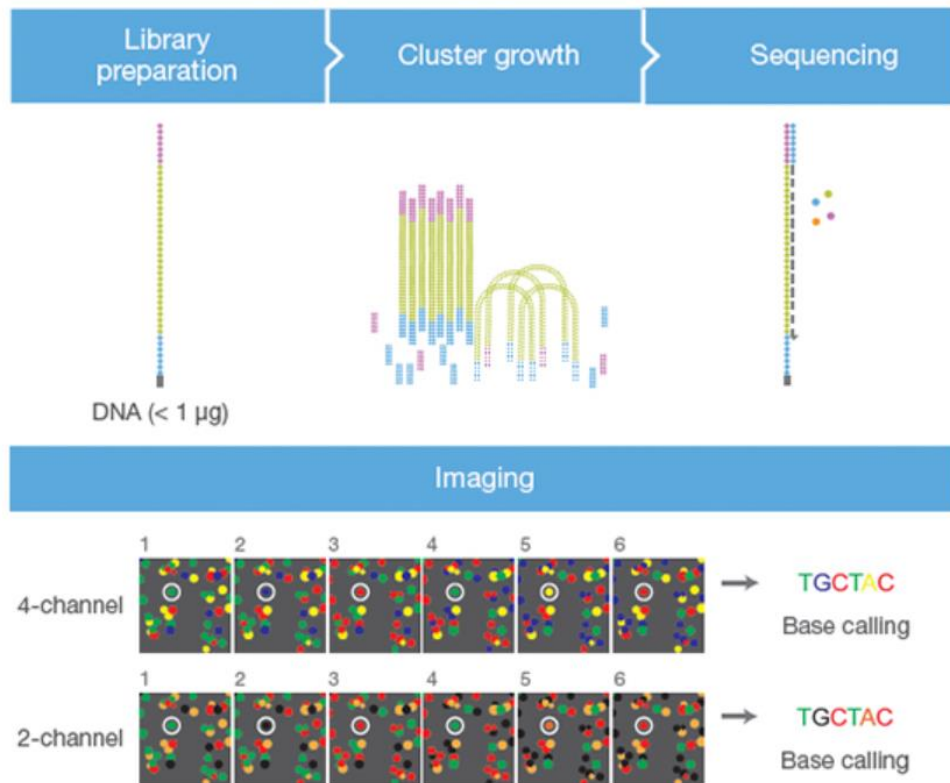
- sequencing-by-synthesis” technology
- Bridge amplification



<https://www.youtube.com/watch?v=fCd6B5HRaZ8>



# ILLUMINA 4 ÉS 2 CSATORNÁS DETEKTÁLÁS



4-Channel Chemistry				
	A	G	T	C
Image 1	●			
Image 2		●		
Image 3			●	
Image 4				●
Result	A	G	T	C

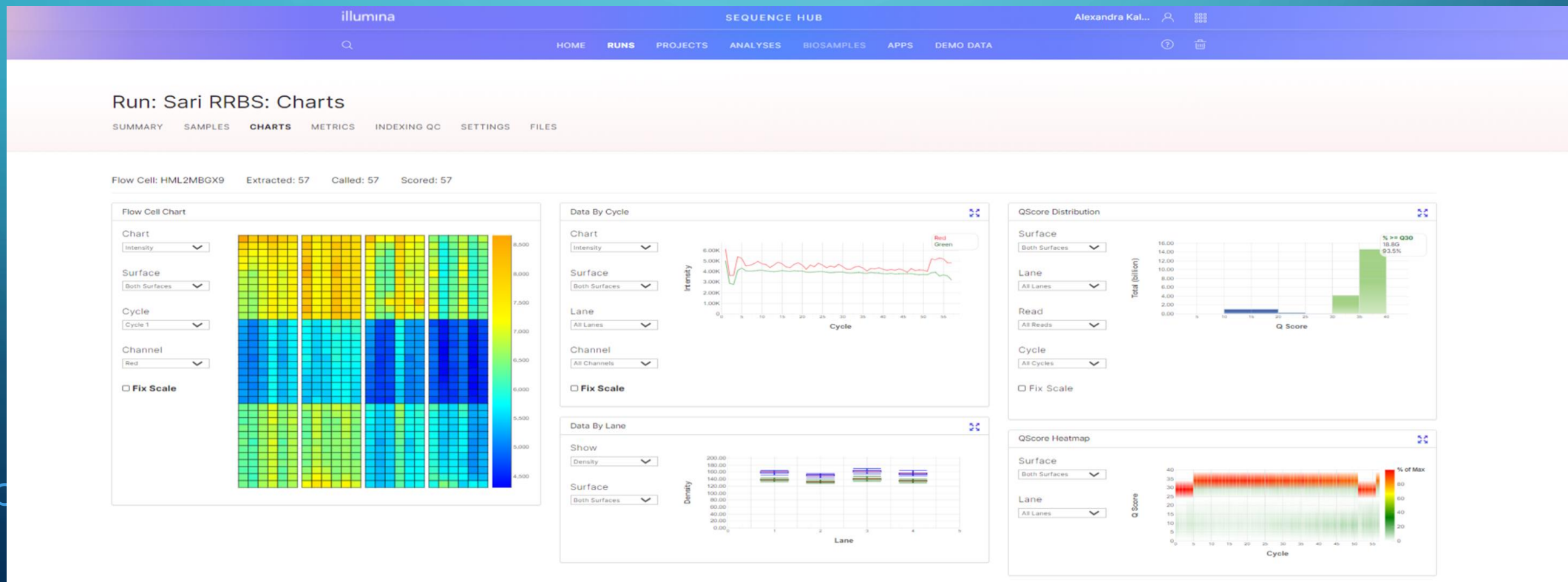
2-Channel Chemistry				
	A	G	T	C
Image 1	●		●	
Image 2	●			●
Result	A	G	T	C

1-Channel Chemistry				
	A	G	T	C
Image 1	●		●	
Image 2			●	●
Result	A	G	T	C

----- Intermediate chemistry step

# ILLUMINA BASESPACE

- Felhő alapú adattárolás, mintanyilvántartás, tervezés, majd a szekvenálások elemzése is lehetséges (iCredit)
- Felhasználói hozzáféréssel bármely szekvenátoron futtatható

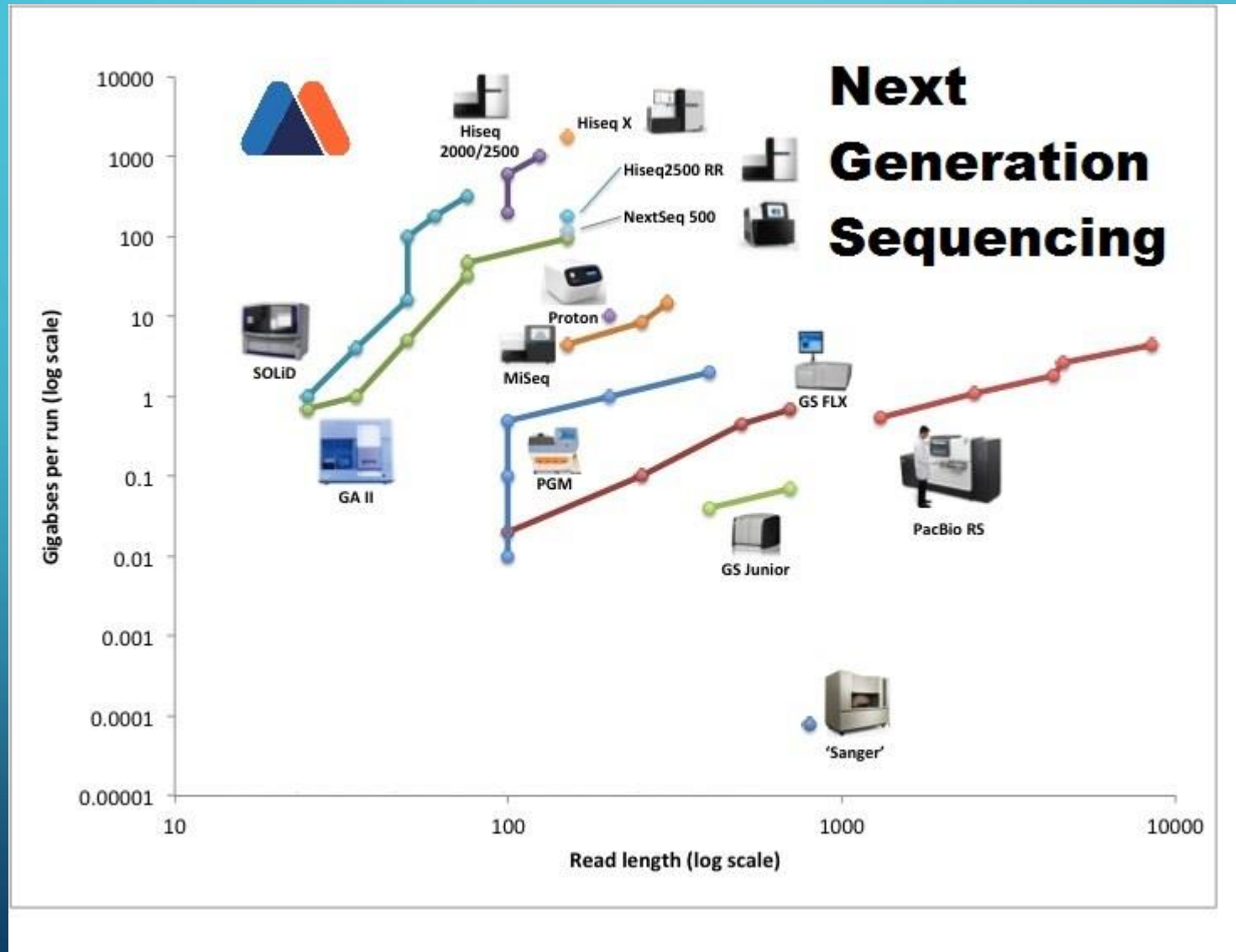


# Comparison Of NGS Platforms

Method	Single-molecule real time sequencing	Ion semiconductor	Pyrosequencing (454)	Sequencing by synthesis (Illumina)	Sequencing by ligation (SOLID sequencing)	Chain termination (Sanger sequencing)
<b>Read length</b>	2900 bp average <sup>1</sup>	200 bp	700 bp	50 to 250 bp	50+35 or 50+50 bp	400 to 900 bp
<b>Accuracy</b>	87% (read length mode), 99% (accuracy mode)	98%	99.9%	98%	99.9%	99.9%
<b>Reads per run</b>	35–75 thousand	up to 5 million	1 million	up to 3 billion	1.2 to 1.4 billion	N/A
<b>Time per run</b>	30 minutes to 2 hours	2 hours	24 hours	1 to 10 days, depending upon sequencer and specified read length	1 to 2 weeks	20 minutes to 3 hours
<b>Cost per 1 million bases</b>	\$2	\$1	\$10	\$0.05 to \$0.15	\$0.13	\$2400
<b>Advantages</b>	Longest read length. Fast. Detects 4mC, 5mC, 6mA.	Less expensive equipment. Fast.	Long read size. Fast.	Potential for high sequence yield, depending upon sequencer model	Low cost per base.	Long individual reads. Useful for many applications.
<b>Disadvantages</b>	Low yield at high accuracy. Equipment can be very expensive.	Homopolymer errors.	Runs are expensive. Homopolymer errors.	Equipment can be very expensive.	Slower than other methods.	More expensive and impractical for larger sequencing projects.



# NGS KÉSZÜLÉKEK KAPACITÁSÁNAK ÖSSZEHAISONLÍTÁSA

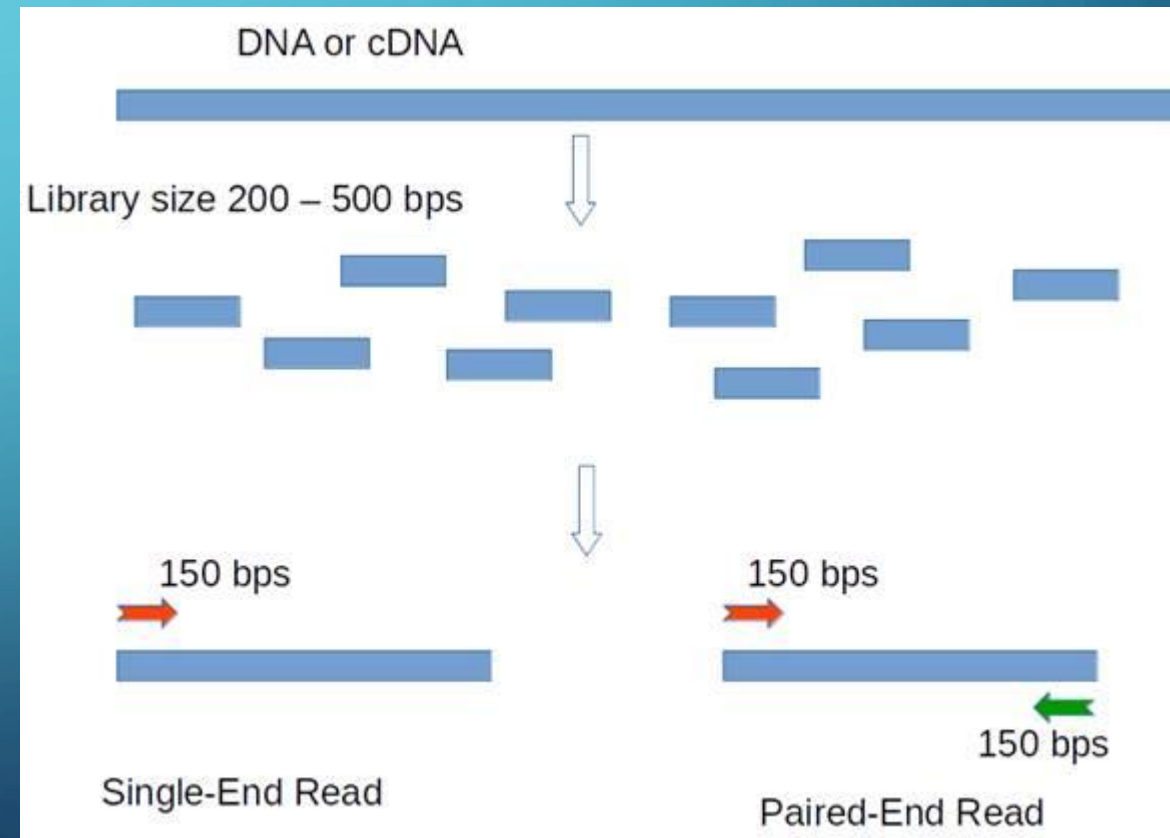


# NGS ALAPFOGALMAK

- Adapter: rövid oligonukleotid szakasz a DNS mintához kapcsolva (a szekvenálási felszínhez való minta kikötődés érdekében)
- Alignment (illesztés): ismeretlen szekvencia illesztése a referenciához
- Covarage (lefedettség): egy adott bázis hányszor van leolvasva
  - Cél függ a mutáció gyakoriságától, ha gyakori a mutáció, akkor alacsonyabb lefedettség is elég
- Contig: in silico létrehozott, átfedő leolvasások összessége
- Flow cell: a szekvenálás felszínét biztosító chip
- Index: rövid oligonukleotid szakasz, amely egy adott mintára specifikus (multiplexálás)
- Insert: a vizsgálni kívánt DNS szakasz, amihez könyvtárkészítés során adaptereket, indexeket kapcsolunk

# NGS ALAPFOGALMAK

- Klonális amplifikáció: 1 molekulából millió felszaporítása
- Könyvtárkészítés: a szekvenálás előkészítő lépése, amely során a vizsgálni kívánt DNS darabokat feldaraboljuk, jelöljük, felsokszorozzuk
- Multiplexálás: egy reakcióban több minta egyidejű, párhuzamos vizsgálata
- Paired-end szekvenálás: a DNS fragmentumot (darabot) mindkét irányból leolvassuk a szekvenálás során



# NGS ALAPFOGALMAK

- Referencia genom: az a már meghatározott szekvenciájú genom, amelyhez az ismeretlen szekvenciát illesztjük
- Read: leolvasás
- Tagmentáció: a DNS feldarabolásának egy enzimatis módja, amely során a feldarabolt DNS végeket jelöljük is
- WES: whole exome sequencing, a teljes exom szekvenálása
- WGS: whole genome sequencing, a teljes genom szekvenálása



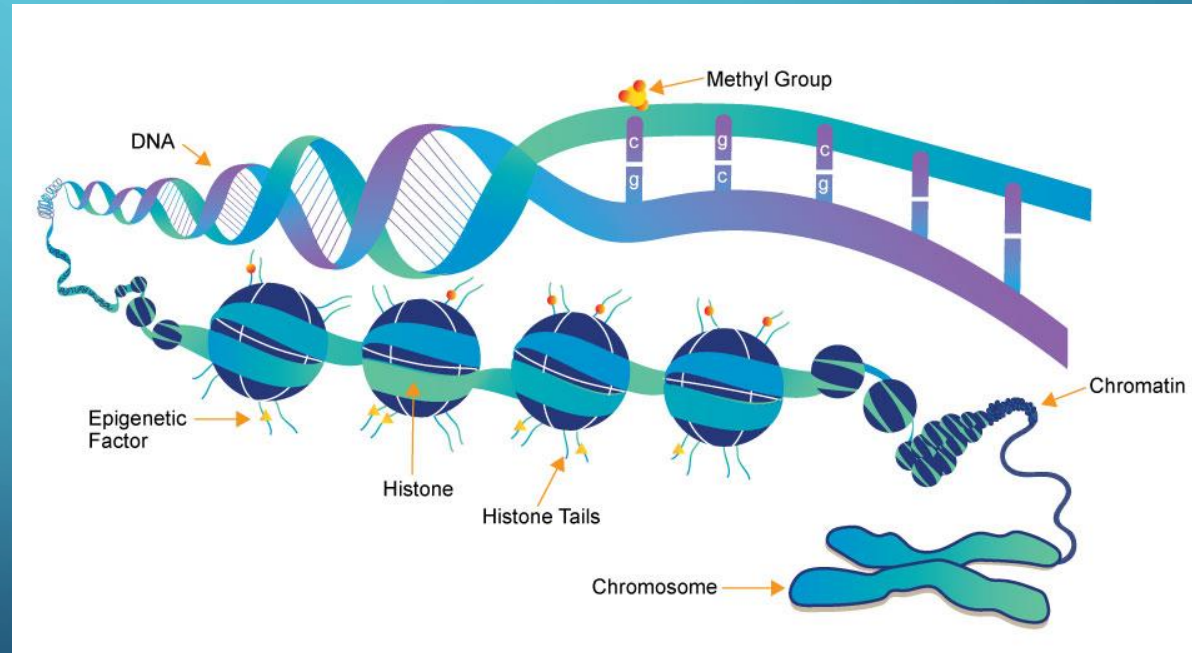
The background is a blue gradient. In the corners, there are white, stylized circuit-like lines with small circles at the ends, resembling a network or data flow diagram.

DNS-EN KÍVÜL MI TÁROLHAT  
MÉG INFORMACIÓT?

# KITEKINTÉS - EPIGENETIKA

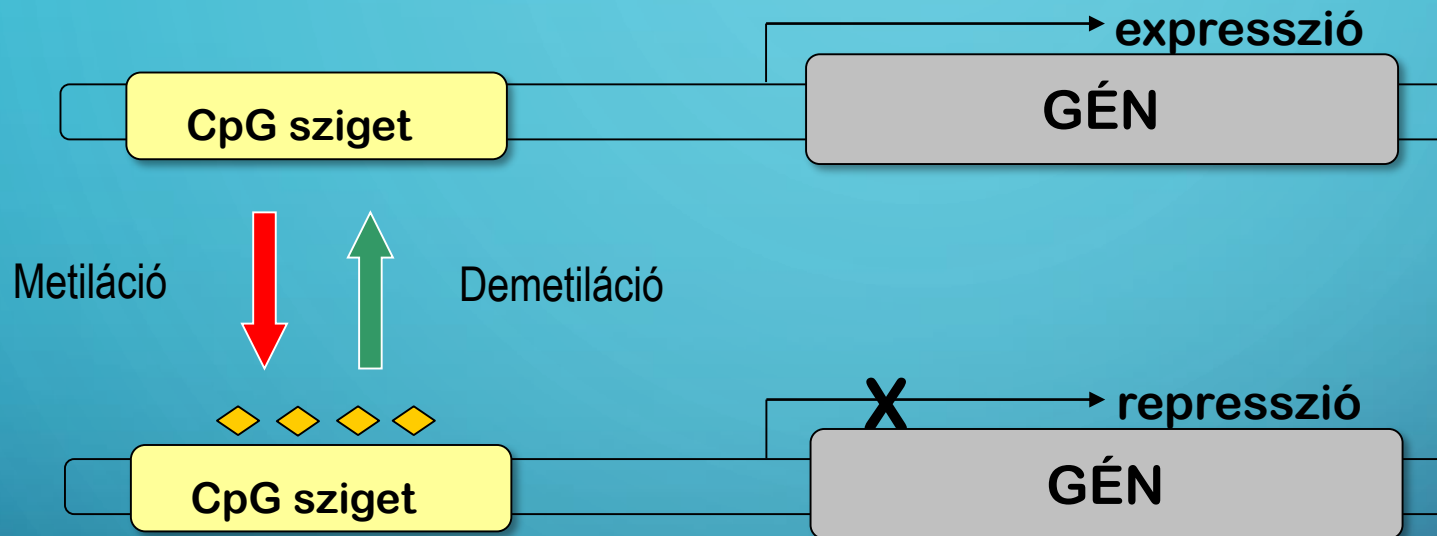
- Az **epigenetika** a modern biológiában a gének olyan öröklődési formájának vizsgálata, amely nem jár együtt a DNS szekvenciájának megváltozásával
- DNS – metiláció
- Hiszton – acetiláció  
metiláció

Nem-kódoló RNS-ek



<https://www.medgadget.com/2019/07/epigenetics-market-share-growth-trends-and-forecast-to-2025-thermo-fisher-scientific-merck-millipore-obcam.html>

# DNS METILÁCIÓ HATÁSA A GÉNEK KIFEJEZŐDÉSÉRE



- ◆ A DNS metiláció során egyes gének szabályozó régiójában lévő CpG szigetek hipermetilációja funkcióvesztéshez vezet
- ◆ A jelenség igazoltan fontos szerepet játszik számos daganatos megbetegedés, köztük a vastagbélrák kialakulásában is
- ◆ A metiláció reverzibilis génkontroll folyamat, mely 5-Aza (5-aza-2'-deoxicitidin) és más demetiláló hatású szerekkel befolyásolható

A daganatképződéshez vezető folyamatban érintett gének azonosítására van szükség

# DNS METILÁCIÓ VIZSGÁLATI MÓDSZEREI

Principle	NGS - based analysis
<b>Bisulfite conversion</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Whole Genome Bisulfite Sequencing (WGBS)</li><li>• Reduced Representation Bisulfite Sequencing (RRBS)</li><li>• Bisulfite Padlock Probes (BSPPs)</li></ul>
<b>Affinity enrichment</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Methylated DNA immunoprecipitation sequencing (MeDIP-seq)</li><li>• Methyl-CpG binding domain protein sequencing (MBD-seq)</li></ul>
<b>Enzyme digestion</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Methyl Sensitive Cut Counting (MSCC)</li><li>• Methyl-seq</li><li>• Methylation-sensitive Restriction Enzyme Sequencing (MRE-Seq)</li></ul>