

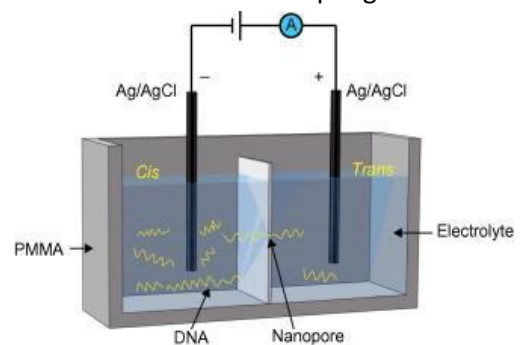
Oxford Nanopore

Oxford Nanopore è un sistema di sequenziamento di terza generazione, che non richiede né un passaggio di amplificazione né la presenza di una DNA polimerasi.

Per sequenziare le molecole di DNA viene utilizzata la misurazione dell'alterazione di corrente prodotta dal transito di molecole di DNA attraverso nanopori. Si esegue quindi una sorta di elettroforesi per guidare il filamento attraverso un nanoporo di dimensioni leggermente maggiori rispetto a quelle del filamento stesso.

I pori sono disposti su una membrana che separa due soluzioni, in ognuna delle quali viene posto un elettrodo. In assenza di DNA il sistema genera una corrente di ioni attraverso il canale, generando una corrente di base.

A causa della carica negativa dei gruppi fosfato che costituiscono il DNA, i filamenti di DNA verranno attratti dal polo positivo. Nel passaggio attraverso il nanoporo, il filamento di DNA blocca parzialmente il flusso di ioni, perturbando l'intensità di corrente, che è una caratteristica distinguibile per ciascuna sottosequenza (non singolo nucleotide).



I Nanopori

I nanopori possono essere divisi in due gruppi: **nanopori sintetici** e **nanopori biologici**.

I nanopori sintetici sono poco usati, mentre tra i nanopori biologici troviamo: l' α -emolisina, la porina A e la proteina Phi29 dell'omonimo batteriofago.

Il diametro e la lunghezza del poro sono caratteristiche specifiche per ciascuna delle proteine.



	α -emolisina	Mycobacterium smegmatis porin A (MspA)	Bacteriophage phi29 (Phi29)
Diameter of channel (nm)	1.4–2.6	1,2	3,6-6
Length of channel (nm)	5,2	3.7	7

Nelle proteine di diametro più piccolo passa solo DNA a singolo filamento, mentre in quelle con diametro più grande può passare DNA a doppio filamento.

L' α -emolisina è una tossina prodotta da *S. aureus*.

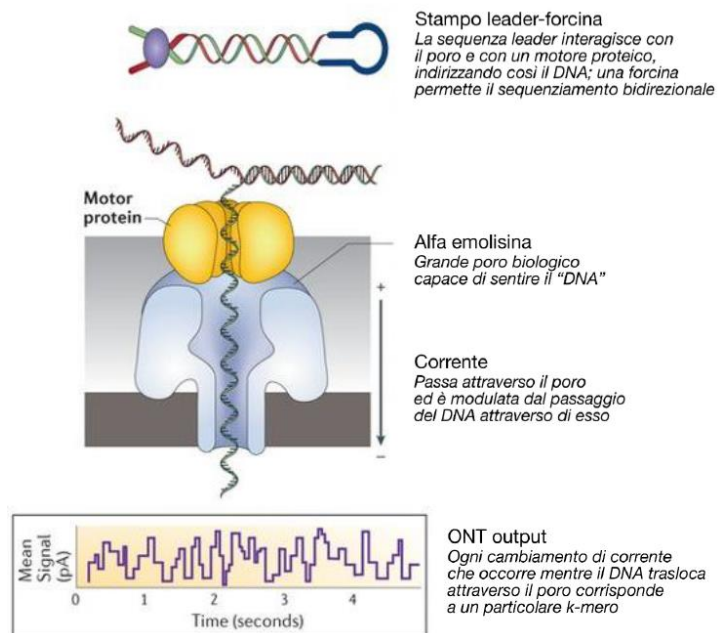
Preparazione della libreria

Il DNA di partenza viene frammentato in frammenti di dimensione consistente, di circa 10.000 bp. Si riparano le estremità con appositi enzimi e si legano due adattatori diversi.

Uno è l'**adattatore leader** mentre l'altro è l'**adattatore forcina**.

L'adattatore leader ha una forma ad Y e lega un *motore proteico*, che regola la velocità di attraversamento del poro. Questo adattatore permette di indirizzare il filamento nel poro.

L'adattatore forcina lega una seconda proteina che prende il nome di **HP motor**, hair-pin motor.



Sequencing

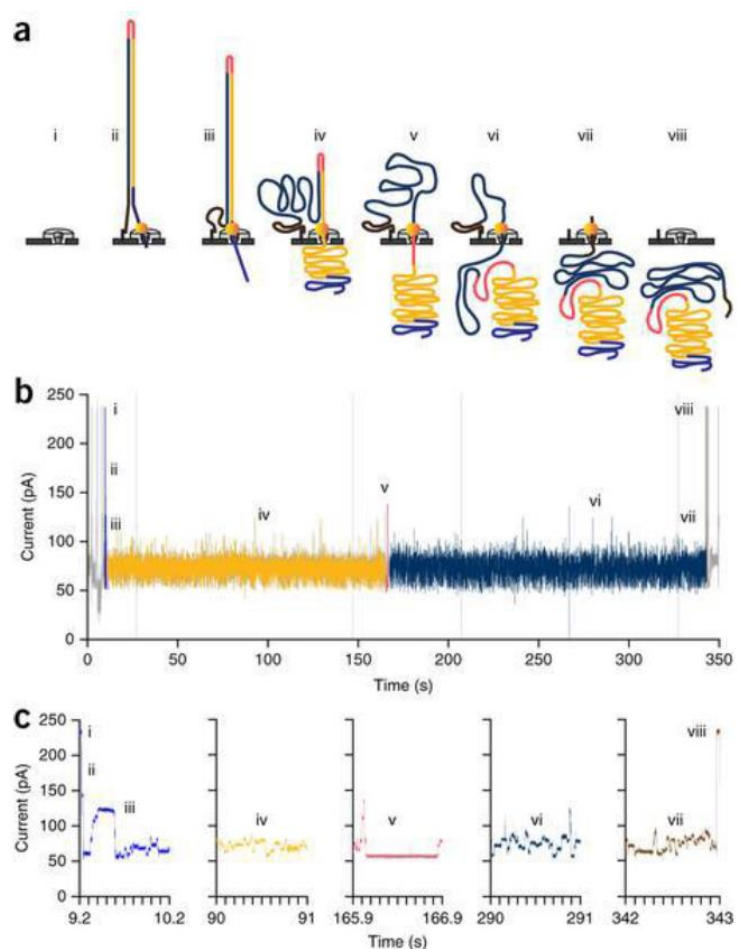
L'apparecchio **MinION** presenta 512 canali che permettono di sequenziare simultaneamente 512 molecole di DNA dalla libreria precedentemente creata.

Il sequenziamento inizia a partire dall'estremità 5' dell'adattatore leader.

Il passaggio del filamento di DNA attraverso il poro avviene applicando una differenza di potenziale tra i due lati della membrana. Il passaggio del DNA nel poro altera il passaggio di ioni, generando una alterazione del voltaggio che è riconducibile ad una specifica sotto-sequenza di 5-6 nucleotidi.

Usa un algoritmo di pattern recognition, allenato su alterazioni di voltaggio causate da sequenze di DNA note, per inferire una sotto-sequenza sconosciuta avendo come input le alterazioni di voltaggio causate dal passaggio della sequenza sconosciuta attraverso il poro.

La molecola motore nella porzione leader inizia a srotolare la molecola di DNA quando la regione ad Y inizia il suo



ingresso nel poro dalla sua estremità (5'??). L'adattatore a forcina è un hairpin che lega il filamento complementare al primo, permettendo l'ingresso del DNA nel poro sotto forma di unico filamento single strand. Il frammento viene quindi letto sia nel DNA senso che antisenso.

Il tasso di errore della metodica Nanopore è abbastanza alto, tra il 15% e 20% (la tabella dice 38%).

Applicazioni delle metodiche di sequenziamento

Risequenziamento di genomi completi

Le piattaforme di sequenziamento permettono di risequenziare genomi completi.

La **produttività** di un apparecchio per il sequenziamento è definita come il numero di sequenze ottenibili per ogni corsa.

Nel 2012 è stato completato il sequenziamento completo di oltre 1000 individui di diverse etnie. Questo è il preludio della medicina personalizzata, dove gli individui potranno ricevere terapie mirate in base al loro assetto genetico.

Sequenziamento genomi completi

Quando non è disponibile il genoma di riferimento, dispositivi che permettono di avere reads lunghe facilitano l'assemblaggio di genomi de novo. Questo perché permettono di avere ampie regioni di riferimento, che poi possono essere sequenziate con alta coverage da metodi come Illumina, per avere una rappresentazione fedele e completa del genoma.

Identificazione di siti polimorfici

Una coverage elevata permette di identificare SNPs e altre mutazioni.

Queste analisi si possono svolgere sull'intero genoma dell'individuo (Whole genome sequencing).

Si possono sequenziare solo le regioni codificanti (Whole Exome Sequencing), previo arricchimento.

Il sequenziamento può anche essere condotto su un pannello di geni, ad esempio per cercare specifiche mutazioni, ed anche questa metodica richiede uno step di arricchimento.

L'arricchimento prevede una ibridazione del genoma da analizzare con sonde specifiche che permettono di legare le regioni desiderate. Una molecola esca, come la biotina, è legata alla sonda e permette di separare le sequenze selezionate dalla miscela, attraverso l'inserimento di un supporto (sferetta magnetica) che lega streptavidina in superficie. Queste sferette vengono poi catturate da un magnete e separate dalla miscela.

Analisi del trascrittoma

Si possono analizzare gli RNA prodotti dalla cellula. In questo caso è necessario il passaggio a cDNA. Forse ci sono sistemi che permettono già di sequenziare direttamente RNA.

Caratterizzazione del metiloma

Mediante il sequenziamento è possibile determinare la metilazione del DNA. Si effettua un sequenziamento prima e dopo il trattamento col bisolfito, che converte la citosina non metilata in uracile.

Si possono identificare i siti di editing, confrontando la sequenza genomica ed i relativi trascritti.

Le piattaforme NGS di gen. 3 è possibile il rilevamento diretto di modificazioni nucleotidiche.

Metagenomica

La metagenomica consiste nel sequenziamento di microrganismi e virus non coltivabili, e lo studio del genoma risultante, spesso alla ricerca di sequenze di enzimi utili da un punto di vista industriale.