

In diesem Skript wird der Versuch unternommen, der Prozess Pyrosequencing so zu erklären, dass Schüler die Chance haben Pyrosequencing zu verstehen.

Es basiert auf einem Vortrag im Rahmen des Science Bridge Seminars von Christoph Schiklenk (2010).

Pyrosequenzierung ist ein weites Feld. Je nachdem was man will, werden verschiedene Methoden angewandt. Hier wird versucht, nur die Kernprinzipien darzustellen. Alles, was aus Sicht des Autors nicht unbedingt zum Verstehen des Prinzips beiträgt wurde weggelassen.

Genauere Informationen können meist auf den Webseiten der Hersteller gefunden werden:

<http://454.com/products-solutions/multimedia-presentations.asp>

<http://www.pyrosequencing.com/DynPage.aspx?id=7454&mn1=1366&mn2=1367>

zu den Grafiken:

Das Bild des Genome Sequencer FLX von 454 entstammt www.454.com

Alle anderen Grafiken sind von Christoph Schiklenk. Bitte geben Sie Science Bridge als Quelle an, wenn Sie sie benutzen.

Basierend auf Publikation:

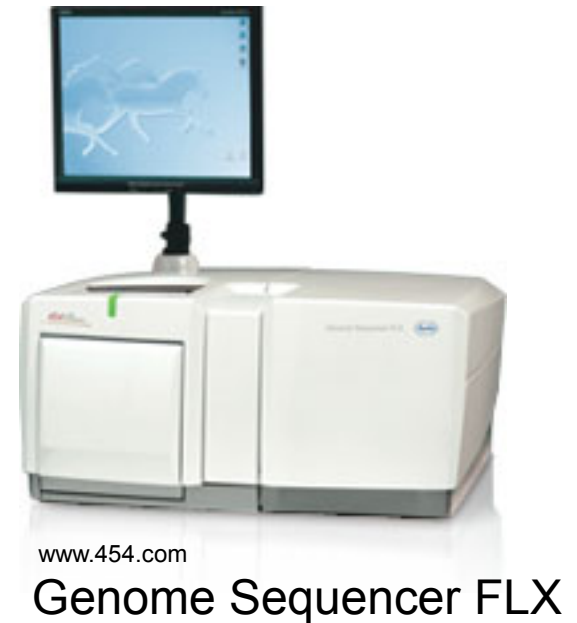
Ahmadian A, Ehn M, Hober S. (2006): Pyrosequencing: history, biochemistry and future; Clin Chim Acta. 363(1-2):83-94.

Pyrosequencing



Was ist Pyrosequencing?

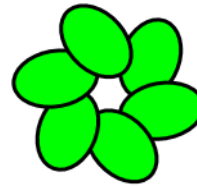
- Methode zur Bestimmung der Basensequenz eines DNA-Strangs
- Beruht auf Pyrophosphat-Produktion bei DNA-Synthese
- automatisierbar / Automatisierung erforderlich
- gleichzeitiges Sequenzieren sehr vieler DNA-Stücke möglich
- 100 Millionen Basen in 10 Stunden



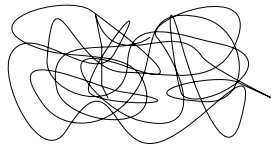
Was braucht man alles für ne Pyrosequenzierung?



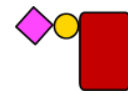
DNA-Polymerase



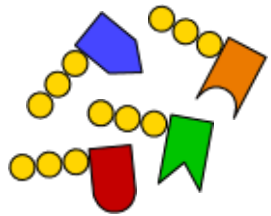
ATP-Sulfurylase



zu sequenzierende
DNA



Adenosin-Phosphosulfat
(APS)



dNTPs



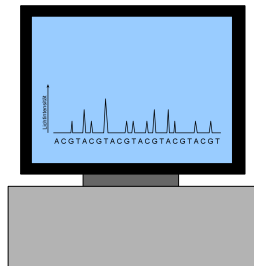
Luziferase



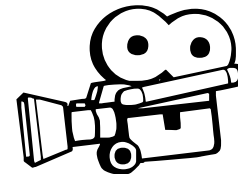
Primer



Apyrase



Computer



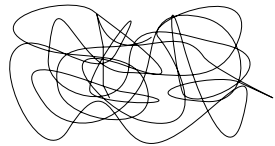
Kamera

Was braucht man alles für ne Pyrosequenzierung?



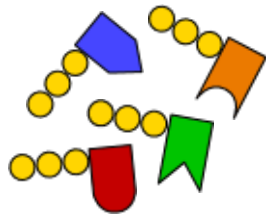
DNA-Polymerase

baut DNA-Stränge aus dNTPs



DNA

die DNA, deren Sequenz bestimmt werden soll



dNTPs

desoxy-Nucleotide aller vier Basen



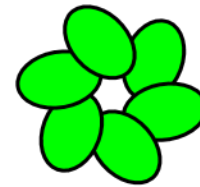
Primer

„Startrampe“ für die Polymerase

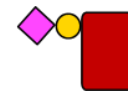
Diese Komponenten sollten aus der PCR schon bekannt sein.

Was braucht man alles für ne Pyrosequenzierung?

ATP-Sulfurylasen können die beiden äußeren Phosphate gegen ein Sulfat tauschen und andersrum



ATP-Sulfurylase



Adenosin-Phosphosulfat (APS)

Luziferase ist ein Enzym aus Glühwürmchen, das leuchten kann



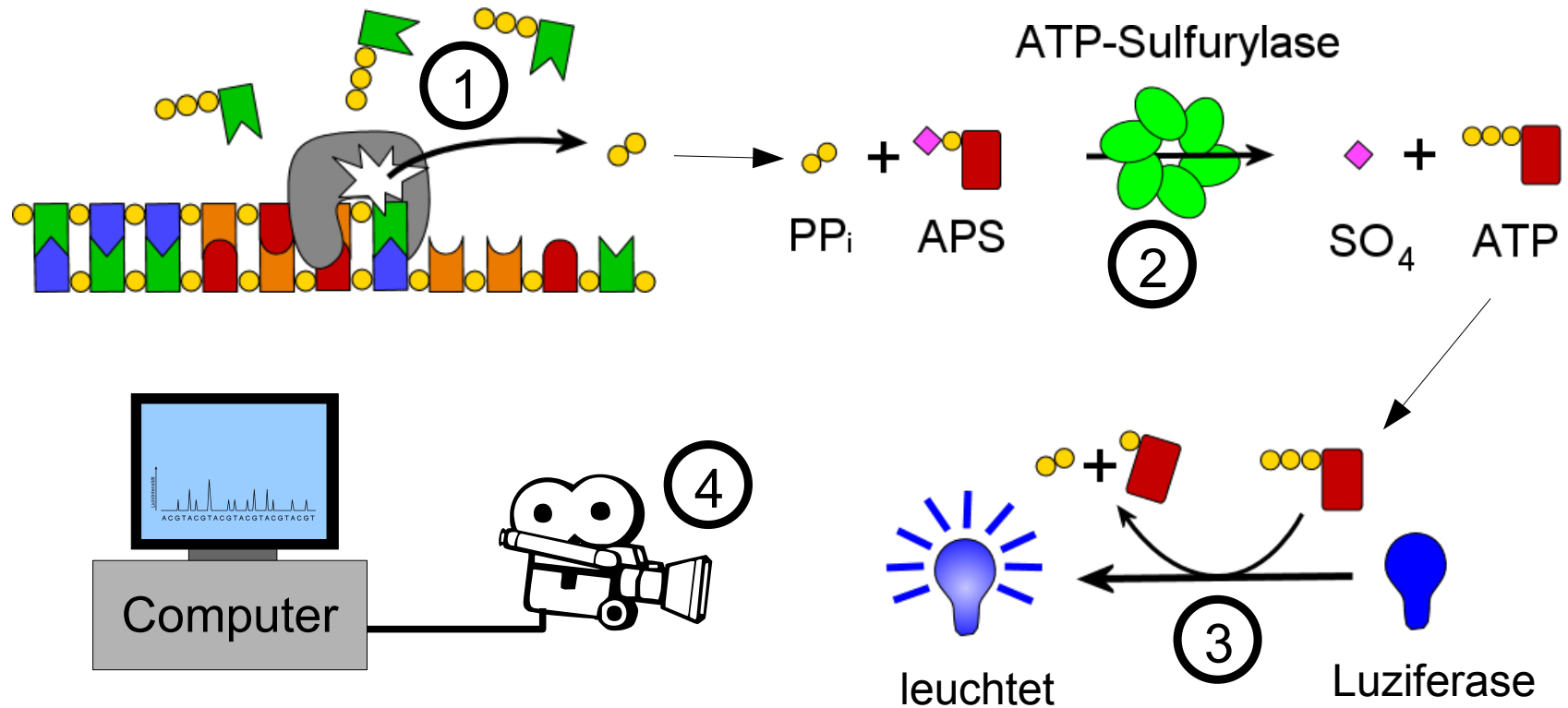
Luziferase

Apyrase zerstört die Bindungen zwischen den Phosphaten



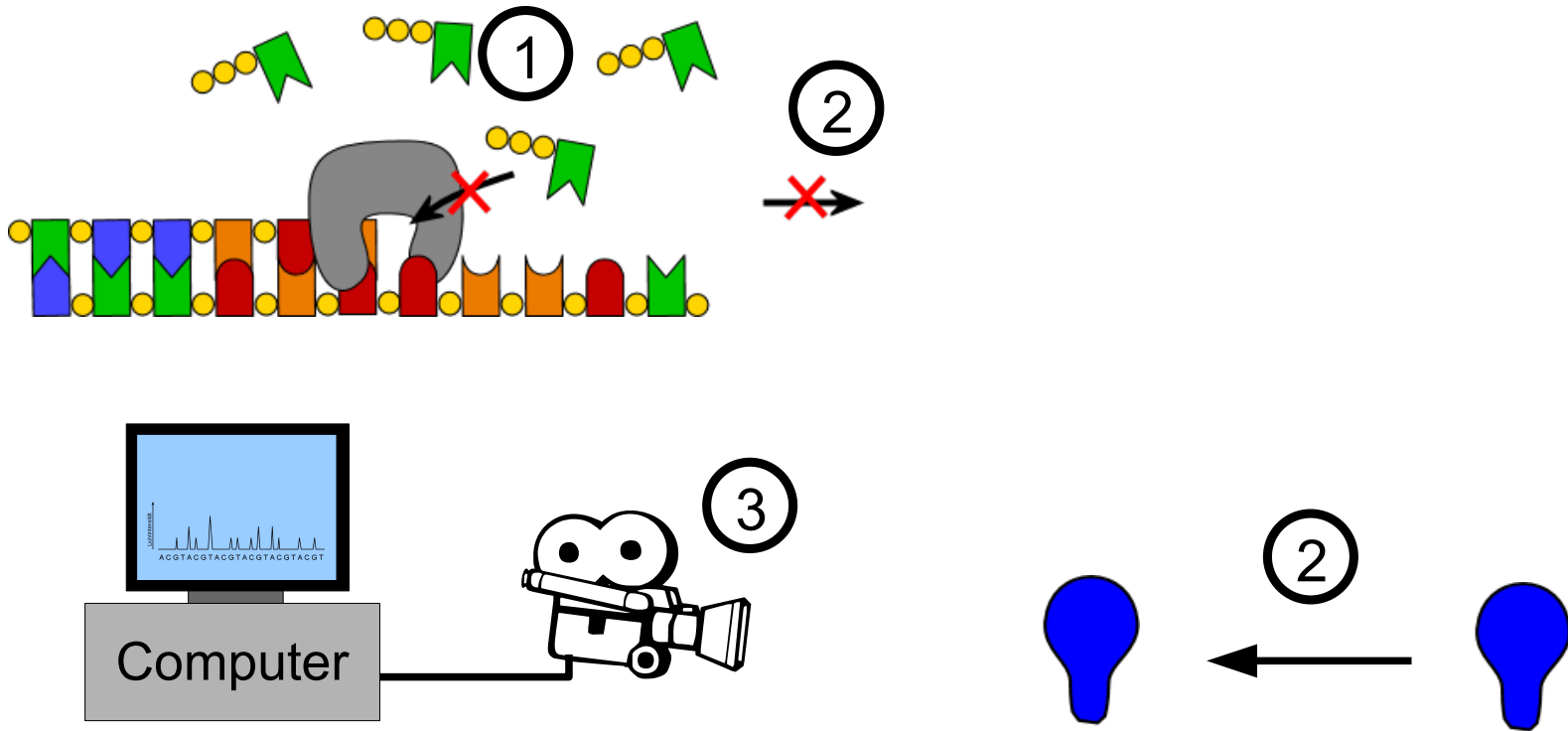
Apyrase

Wie funktioniert Pyrosequenzierung?



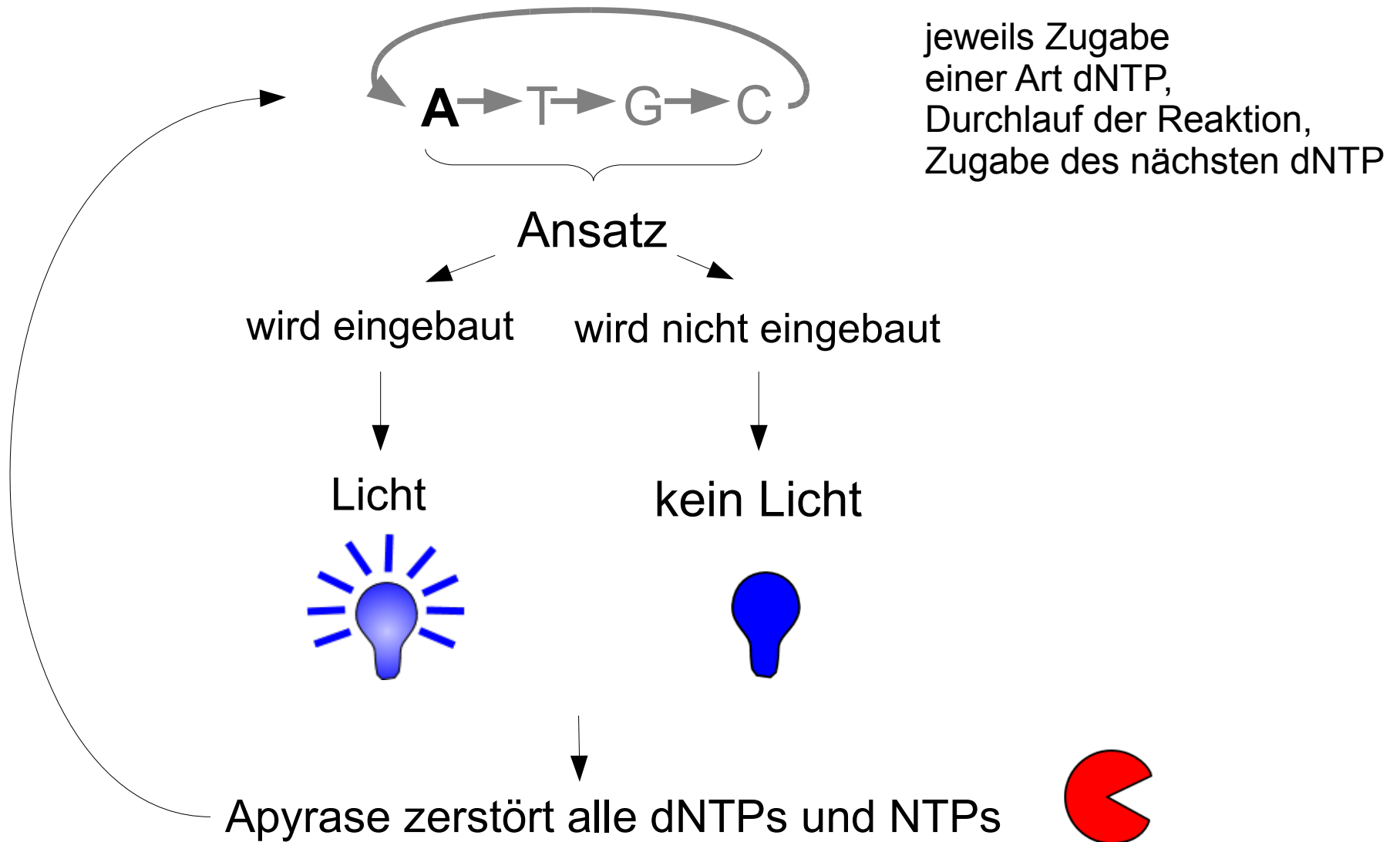
1. Base wird eingebaut, PP_i wird abgespalten
2. Sulfurylase macht aus PP_i mit APS \rightarrow ATP
3. ATP bringt Luziferase zum leuchten
4. Kamera nimmt Licht auf und überträgt Signal an PC

Wie funktioniert Pyrosequenzierung?



1. Base wird nicht eingebaut
2. kein Pyrophosphat – kein ATP - kein Licht
3. kein Lichtsignal am Computer

Wie funktioniert Pyrosequenzierung?



Wie funktioniert Pyrosequenzierung?

Die **Lichtintensität** ist **proportional** zur **PP_i-Konzentration**.

Werden 3 gleiche Basen hintereinander eingebaut, ist das Licht 3 mal heller.



Welche Sequenz hätte also diese Lichtsignalfolge?

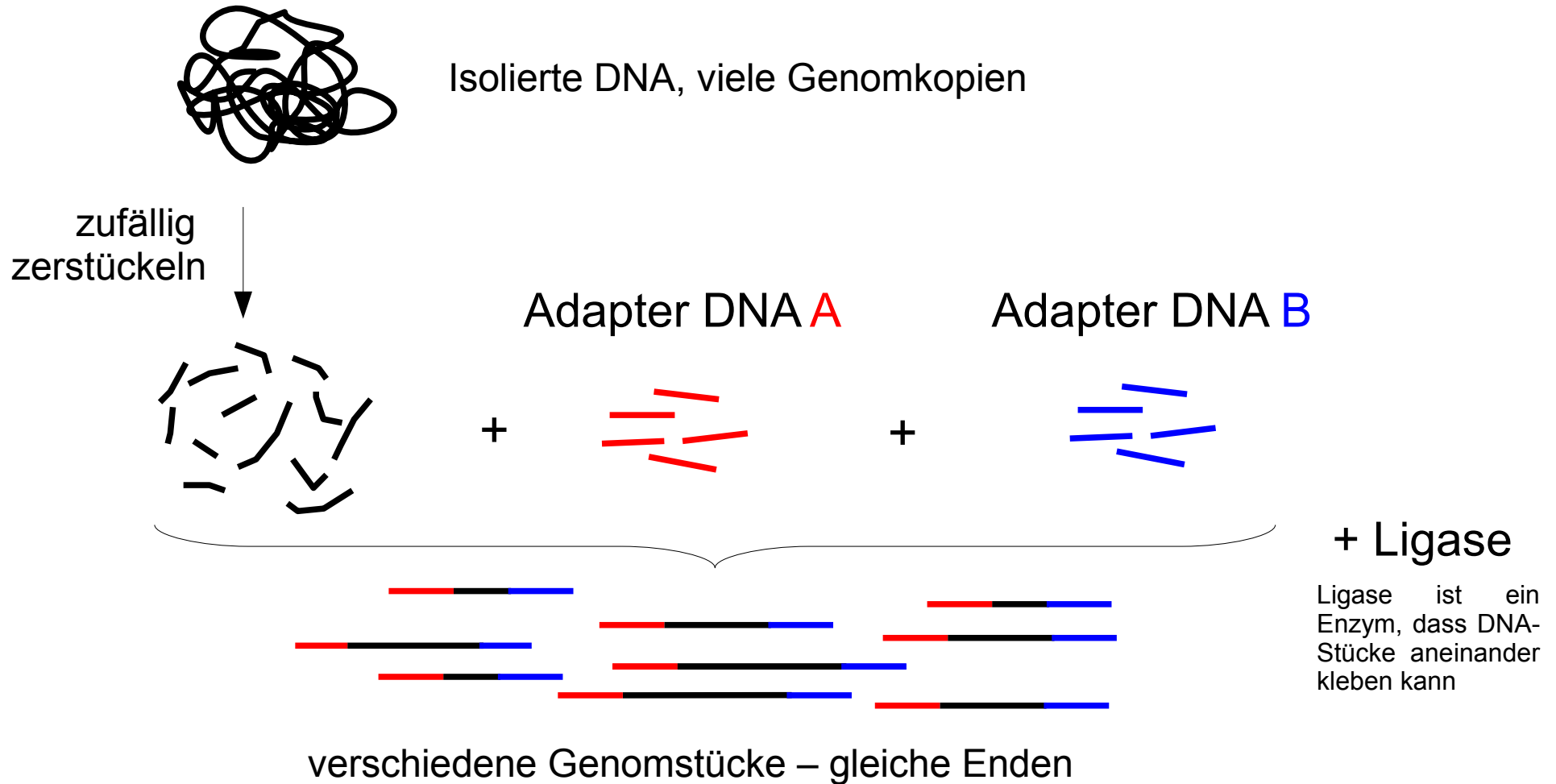
→ GAACTTTGTCGGAACAG

Wie pyrosequenziert man ein Genom ?



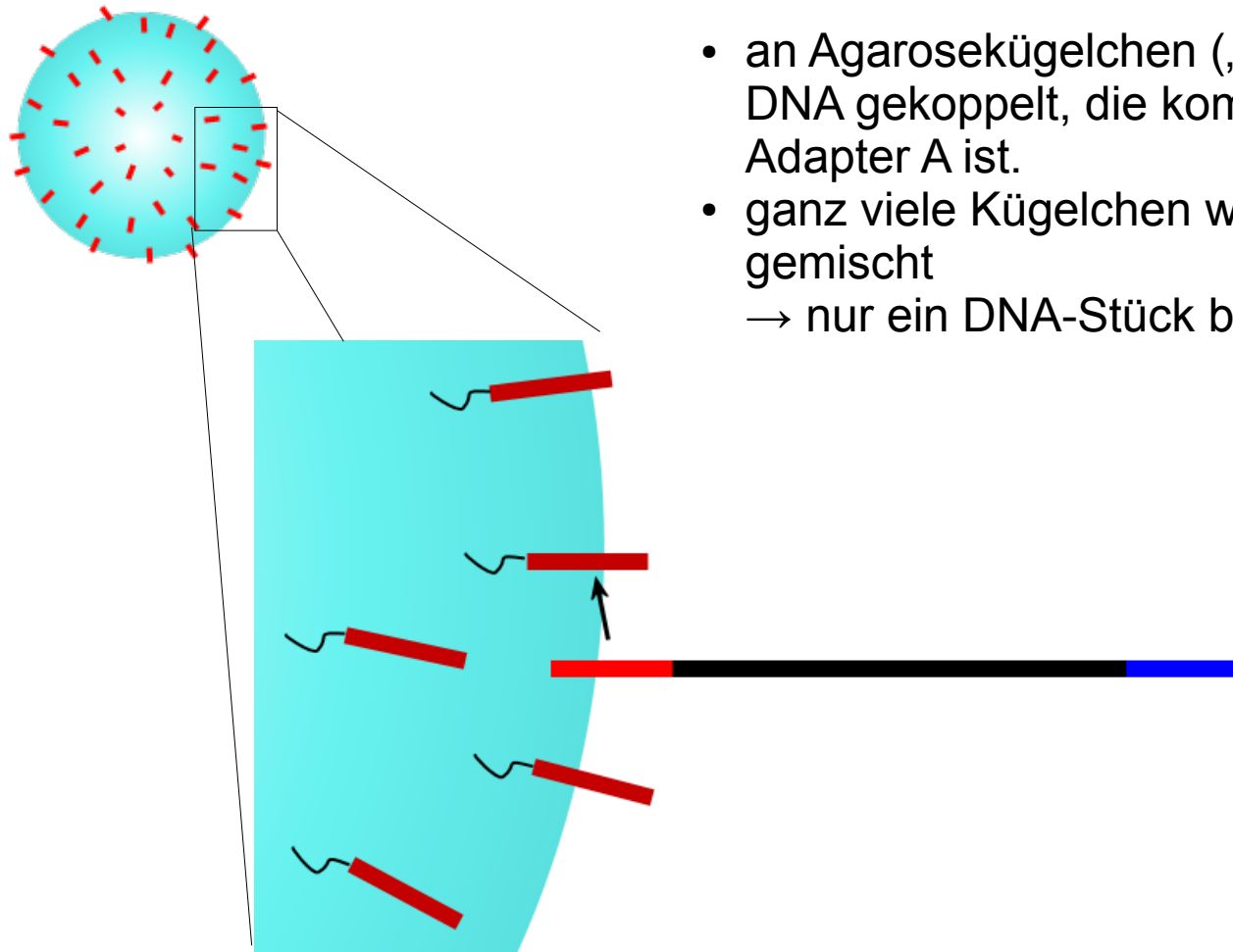
Wie pyrosequenziert man ein Genom ?

1. Adapterligation



Wie pyrosequenziert man ein Genom ?

2. Kopplung an Agarosekügelchen

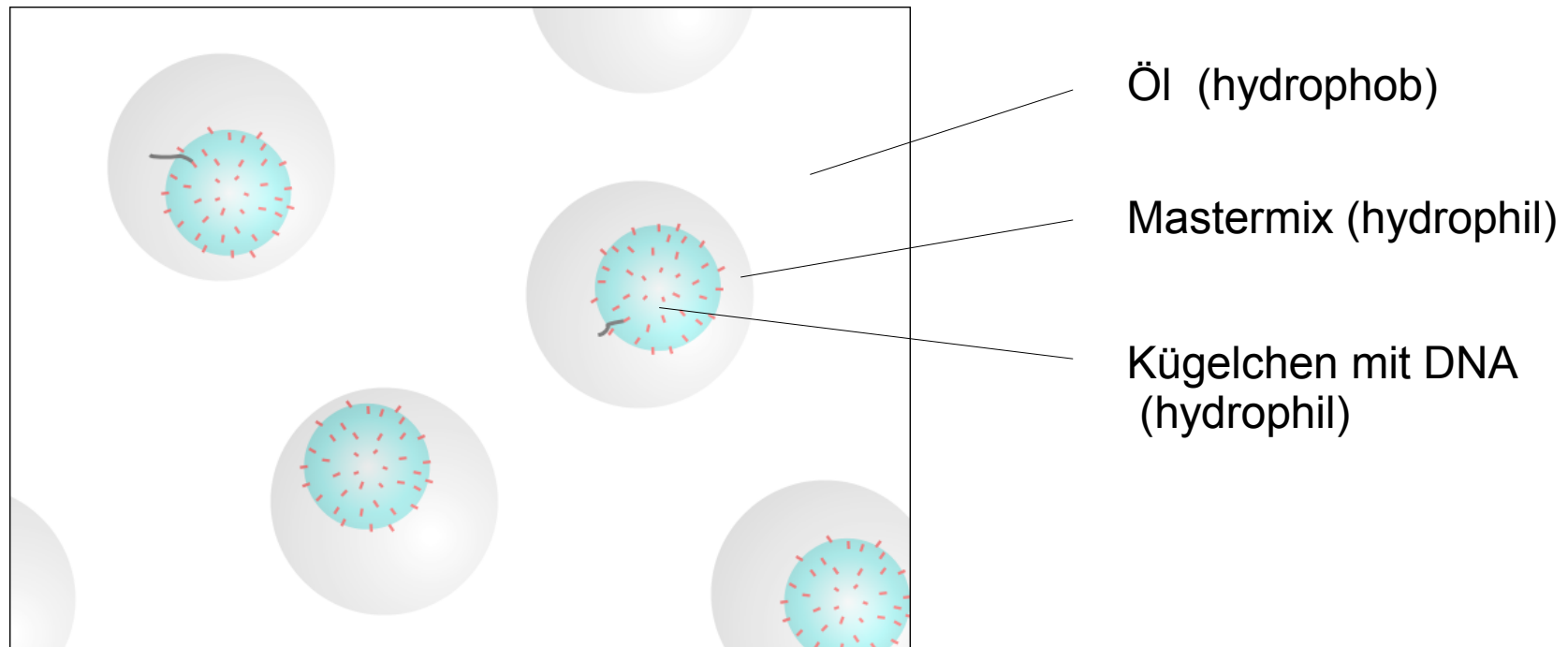


- an Agarosekügelchen („bead“) ist DNA gekoppelt, die komplementär zu Adapter A ist.
- ganz viele Kügelchen wird mit wenig DNA gemischt
→ nur ein DNA-Stück bindet pro Kügelchen

Wie pyrosequenziert man ein Genom ?

3. emPCR: Emulsions-PCR

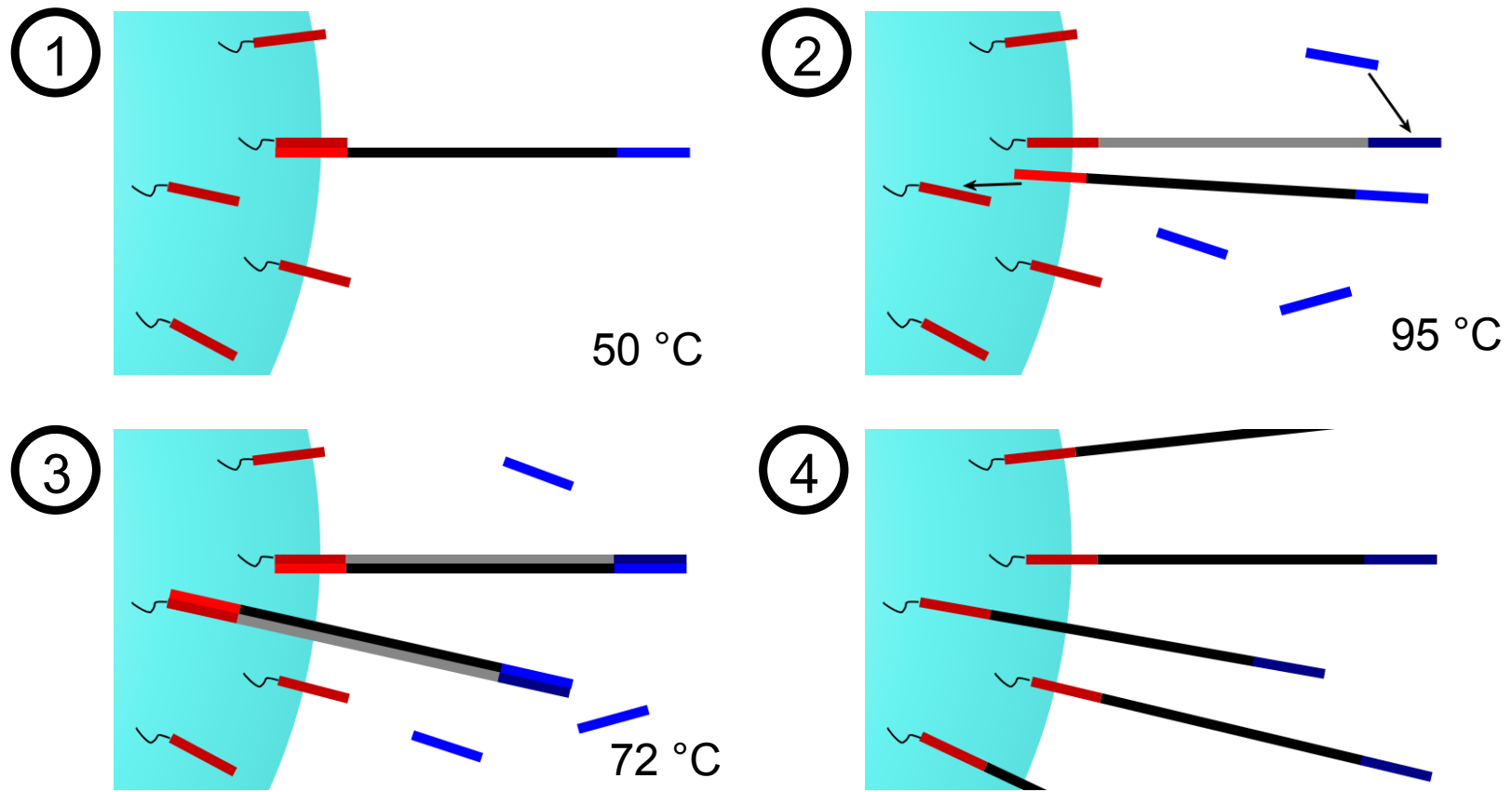
- Emulsion: feines Gemisch, ineinander unlöslicher Flüssigkeiten (z. B. Wasser und Öl, geschüttelt)
- Normaler PCR-Ansatz mit Primern der B-Sequenz
- → „Mastermixblasen“ um die Kügelchen, getrennte PCR-Reaktionen



Wie pyrosequenziert man ein Genom ?

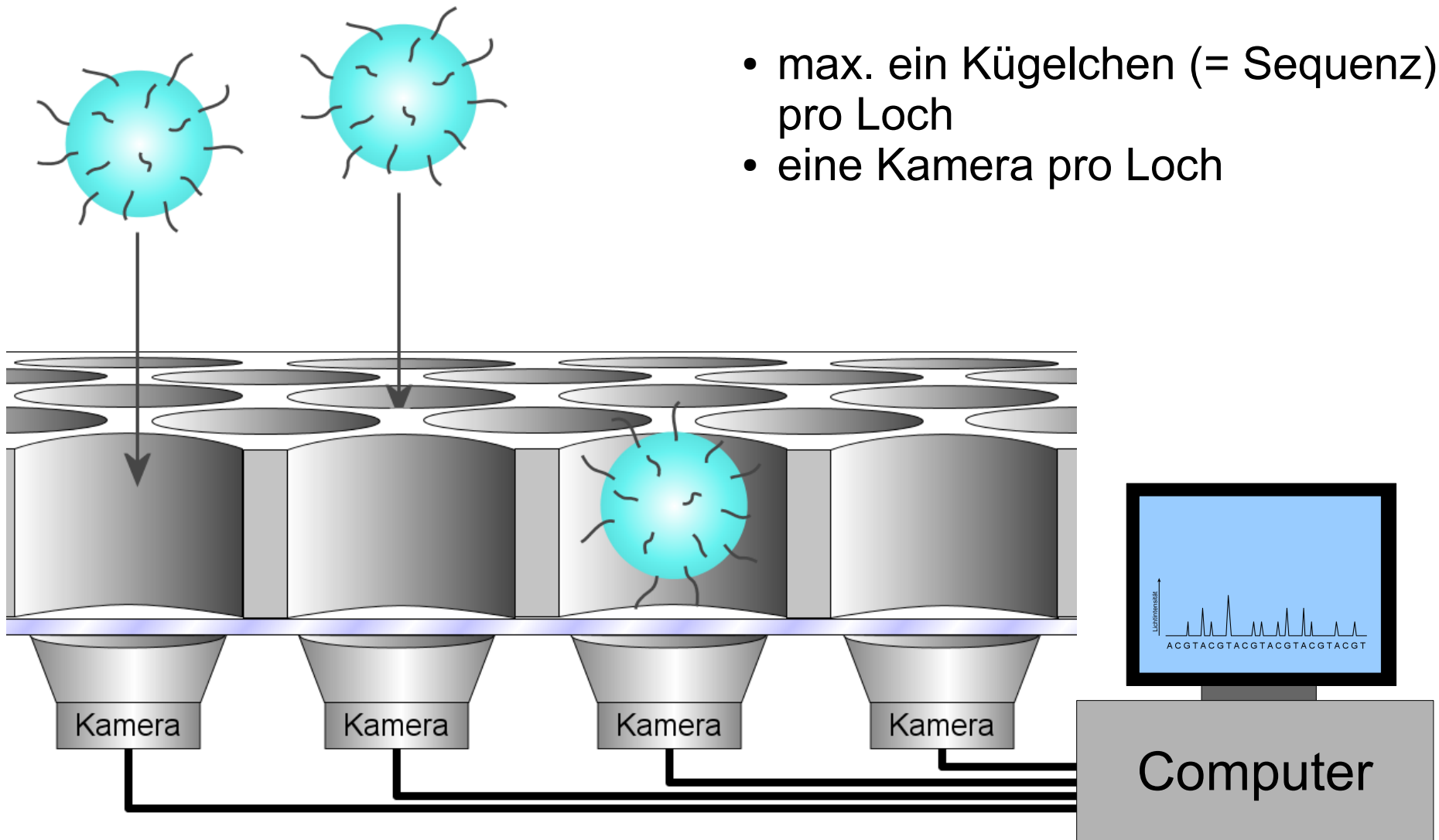
3. emPCR: Emulsions-PCR

PCR mit Adapter B als Primer (Adapter A komplementär als 2. Primer)
→ Übertragung der komplementären Sequenz auf alle Primer am Bead



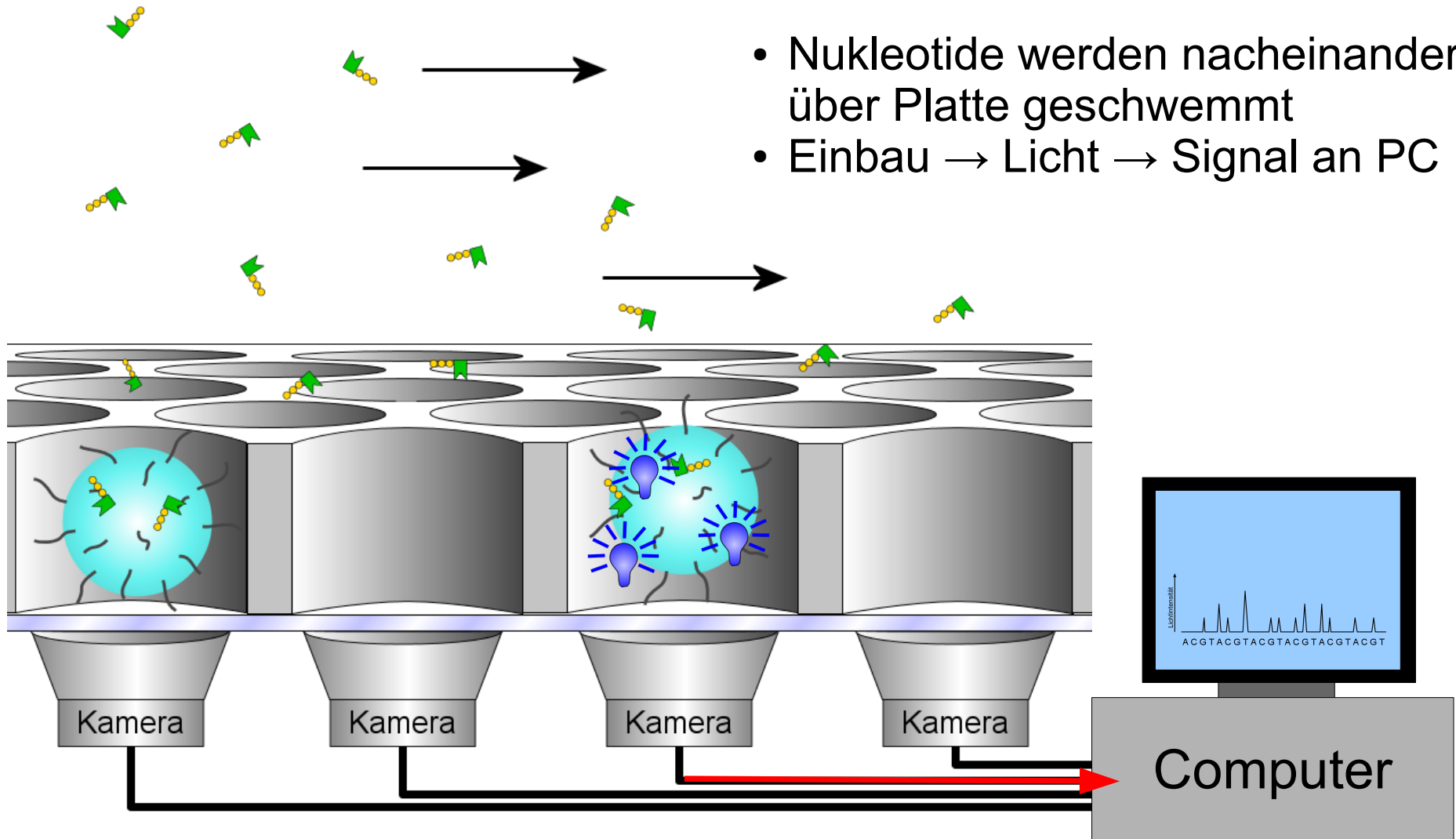
Wie pyrosequenziert man ein Genom ?

- max. ein Kügelchen (= Sequenz) pro Loch
- eine Kamera pro Loch



Wie pyrosequenziert man ein Genom ?

- Nukleotide werden nacheinander über Platte geschwemmt
- Einbau → Licht → Signal an PC



Wie pyrosequenziert man ein Genom ?

ca. 400 000 Sequenzauslesungen á ~ 250 Basen
= 100 Mio Basen in einem Schritt

Da die isolierte DNA aus vielen Genomkopien besteht und zufällig zerstückelt wurde kann man die Genom-Sequenz aus Überlappungen rekonstruieren.

Loch 1 **CGCTAGCTAGAGATCGATACAATCG**
Loch 2 **GATACAATCGAGAGTTGATAGCCTCG**
Loch 3 **TTGATAGCCTCGAGCTT**

Dies erfordert sehr viel Rechenleistung und kann bei repetitiven Sequenzen problematisch werden.

