DNA-volgordes direct zichtbaar met optical mapping

'Seeing is believing'

Nieuwe optical mapping-apparatuur van Wageningen UR maakt het mogelijk om DNA- volgordes van complete chromosomen rechtstreeks te bekijken met fluorescente labeling. De techniek kan de opheldering van onbekende genomen met Next Geneneration Sequencing drastisch versnellen en verbeteren.

Els van den Brink | Fotografie: Sven Warris

De opheldering van een genoom met behulp van *Next Generation Sequencing* verloopt lang niet altijd zo vlot als wel wordt gesuggereerd. Het bepalen van de volgorde zelf is binnen een paar weken klaar, maar de daarop volgende data-analyse duurt vaak wel enkele maanden. De sequencing-apparatuur knipt het DNA namelijk in allemaal korte stukjes. De grootste uitdaging is om vervolgens al die puzzelstukjes samen te voegen tot een kloppend geheel. Dat is vooral lastig bij stukken DNA die bestaan uit herhalingen van eenzelfde korte sequentie. Vaak is het niet goed mogelijk om vast te stellen hoe vaak deze sequentie wordt herhaald.

Bij het genoom van mens en dier valt dit probleem nog mee, maar plantengenomen kunnen voor 85% uit zulke repeterende DNA-sequenties bestaan. Wageningen UR beschikt daarom sinds kort over nieuwe apparatuur die hiervoor een oplossing kan bieden. Het gaat om een Irys System van Bionano Genomics, dat *optical mapping* gebruikt bij de DNA- analyses. Wageningen UR is de eerste in Nederland die dergelijke apparatuur heeft staan.

Gabino Sanchez-Perez, hoofd Toegepaste Bio-informatica bij Wageningen UR: "Het revolutionaire van deze techniek is dat je het DNA echt ziét."

Revolutionair

Optical mapping is niet de opvolger van Next Generation Sequencing, maar eerder een complementaire technologie. Het apparaat bepaalt namelijk niet de complete DNA-sequentie, maar alleen een soort barcode. Het doet dat echter wel voor complete chromosomen, die nog zo veel mogelijk intact zijn. Gabino Sanchez-Perez, hoofd Toegepaste Bio-informatica bij Wageningen UR, is verantwoordelijk voor de nieuwe apparatuur. Hij vertelt enthousiast: "Het revolutionaire van deze techniek is dat je het DNA echt ziét. *Seeing is believing*. Je kijkt gewoon naar het DNA zelf, en dat maakt de gegevens zo betrouwbaar."

Fluorescente barcode

Voor optical mapping moet het DNA zo intact mogelijk blijven tijdens de isolatie. Sanchez-Perez: "Dat is op dit moment de bottleneck, met name voor planten. Daar heb je bijvoorbeeld te maken met een celwand en fenolen die de procedure kunnen verstoren. Na wat pionieren lukt dat nu aardig goed."

Het DNA wordt vervolgens geknipt door een restrictie-enzym. Dit knipt een van de DNA-strengen op alle plekken waar een specifieke DNA-volgorde van een stuk of zeven nucleotides voorkomt. Vervolgens worden al deze gaten weer opgevuld, maar dit keer met fluorescent gelabelde nucleotides. Het resultaat is weer een complete DNA-streng, die nu op verschillende plekken fluorescent gelabeld is. Dit gelabelde DNA wordt ingespoten in een speciale chip. Die bevat een heleboel kleine kanaaltjes die precies breed genoeg zijn voor één DNA-streng. Het DNA wordt uitgestrekt en stroomt daarna door deze kanaaltjes, terwijl het ondertussen wordt gefotografeerd. Het apparaat kan de afstanden meten tussen de fluorescentie labels en op basis daarvan een barcode opstellen voor het complete chromosoom.

Genomen controleren

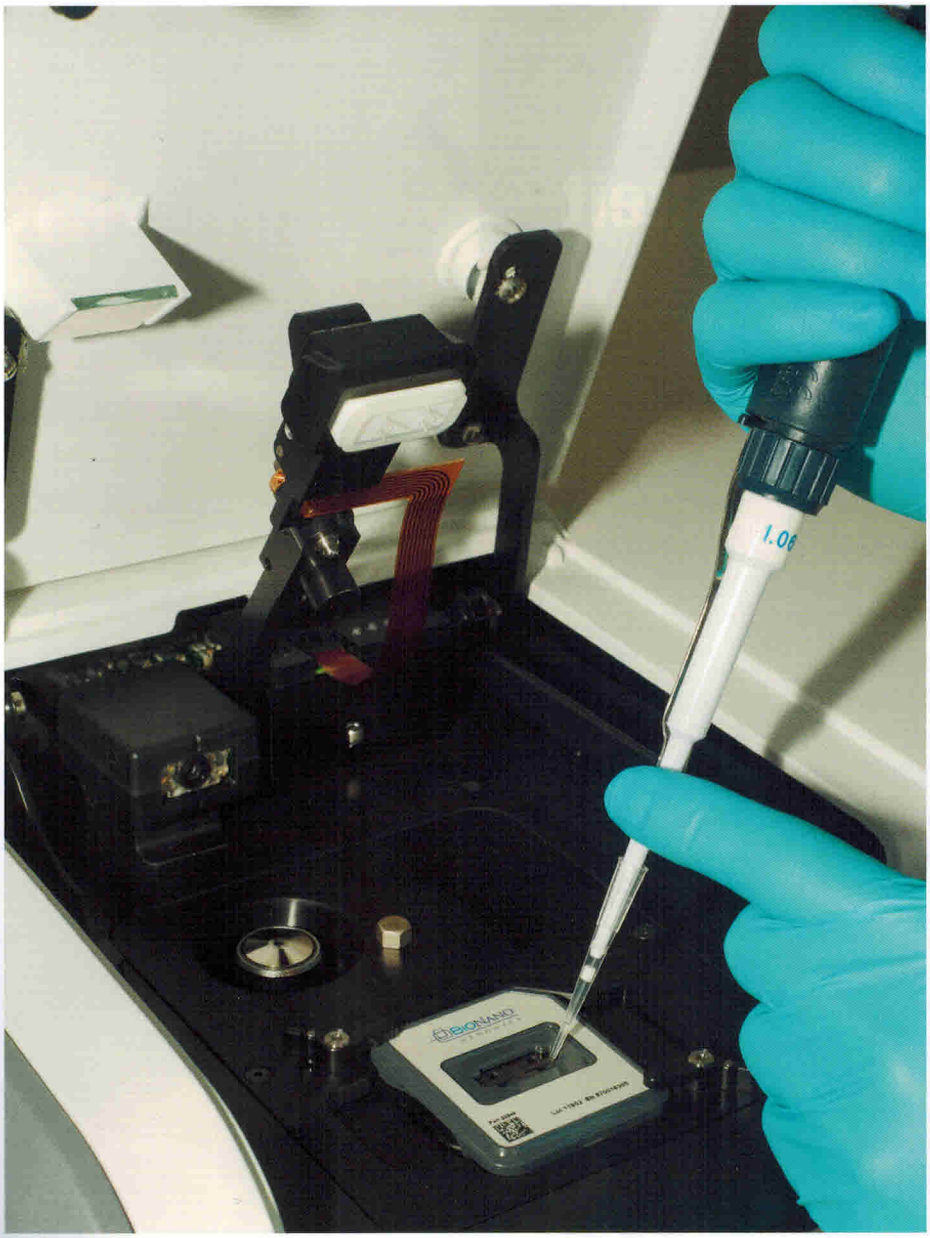
Sanchez-Perez ziet twee belangrijke toepassingen voor genoomanalyses met behulp van optical mapping. Allereerst kan de techniek gebruikt worden om opgehelderde genomen te controleren. Op basis van een gesequenst genoom kan voorspeld worden op welke posities de restrictie-enzymen zouden moeten knippen en wat dit voor barcode zou moeten opleveren. Vervolgens kan gekeken worden of dit klopt met wat in werkelijkheid is te zien na de fluorescente labeling. Sanchez-Perez vertelt: "We hebben al meerdere genomen geanalyseerd en heel wat fouten vastgesteld in referentiegenomen. Soms bleek er toch een insertie in te zitten die bij het sequensen was gemist, of waren bepaalde delen van het genoom verwisseld. En dat terwijl zulke genomen vaak door een hele onderzoeksgemeenschap voor waarheid worden aangenomen. Wij willen dat graag verbeteren. Als we zulke fouten tegenkomen, nemen we contact op met degene die het referentiegenoom beheert, om hen daarop te wijzen en samen het referentiegenoom aan te passen."

'We hebben heel wat fouten vastgesteld in referentiegenomen'

De tweede toepassing van optical mapping is voor *de novo sequencing* – de DNA-volgorde bepalen van onbekende genomen. Het gaat dan om een combinatie van optical mapping en Next Generation Sequencing. Met de barcode van de optical mapping-analyse is het veel makkelijker om de puzzelstukjes te combineren op de juiste manier. "Wij kunnen nu binnen een paar weken een compleet genoom ophelderen, inclusief de *data assembly*. Daarbij is het ook nog een relatief goedkope technologie, want zo'n chip kost niet meer dan een paar duizend euro."

Kruis- en tumoronderzoek

Sanchez-Perez wil de technologie zelf vooral gebruiken voor de opheldering van plantengenomen, bijvoorbeeld van de tomaat,



Pipetteren van DNA-materiaal op de chip van Bionano Genomics.

aardappel en sla. Plantengenomen zijn vaak heel complex en daardoor lastig te sequensen. Ze zijn namelijk erg groot – soms wel vijf keer zo groot als het humane genoom – en bevatten soms wel vier of acht varianten van eenzelfde chromosoom en heel veel repeterende sequenties. Doordat Sanchez-Perez hiermee de exacte locatie van interessante genen kan vaststellen, kan hij telers hiermee beter adviseren over het kruisen van verschillende rassen.

Vanuit andere onderzoeksterreinen is ook al interesse getoond voor de technologie. Onderzoekers in ziekenhuizen lopen er bijvoorbeeld ook tegenaan dat referentiegenomen niet altijd correct zijn. Bovendien kan de technologie voor hen nieuwe mogelijkheden bieden, bijvoorbeeld voor onderzoek bij kankerpatiënten. Zo zouden ze bij een patient het DNA van gezond weefsel kunnen vergelijken met het DNA van tumorweefsel om genetische afwijkingen te kunnen relateren aan de tumorontwikkeling. Met sequencing was dit voorheen niet mogelijk, omdat het vaak gaat om DNA-verwisselingen die je via traditionele sequencing-methodes over het hoofd ziet. Deze en andere onderzoekers bij kennisinstellingen en bedrijven kunnen ook gebruik maken van het nieuwe Irys-apparaat in Wageningen. De apparatuur maakt namelijk deel uit van CAT-Agro-Food Shared Research Facilities en is daarom ook voor andere onderzoekers toegankelijk. **LM**

CARL ROTH®

Tot 31 december 2015...

BESTELLEN en SPAREN

Analyseweegschalen HR-serie

- Modellen van 42 tot 310 g beschikbaar
- Afleesbaarheid 0,0001 g
- Interne kalibratie
- Windscherm
- 5 jaar garantie

Bestelnr.: CTE2.1 tot 9.1

vanaf 599,-€

Direct bestellen:
0180 51 67 04
bestellingen@carlroth.nl

LABORATORIUM-BENODIGDHEDEN
LIFE SCIENCE
CHEMICALIËN

www.carlroth.nl