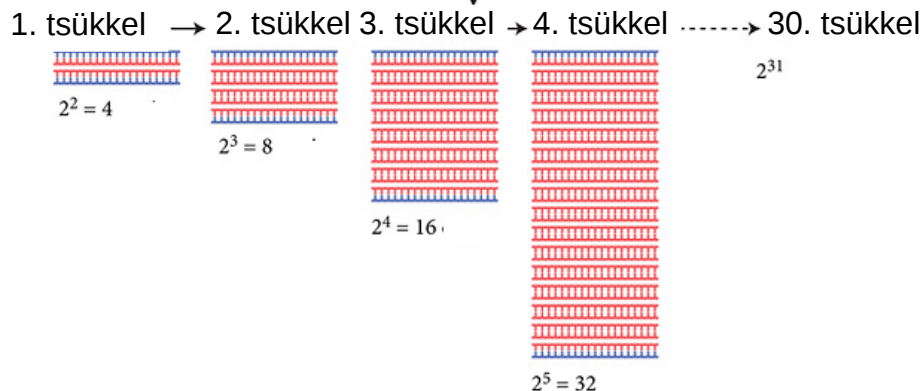
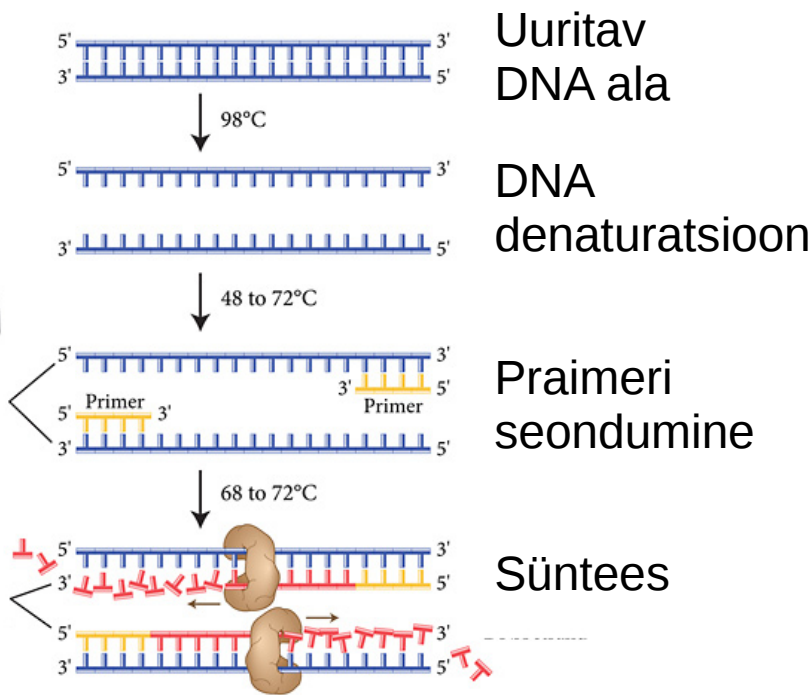


DNA põhine mikrobioloogia - avanevad võimalused

Veljo Kisand

Tartu Ülikooli tehnoloogiainstituut

Traditsiooniline DNA põhine molekulaardiagnostika



EELDUSED ja EELISED

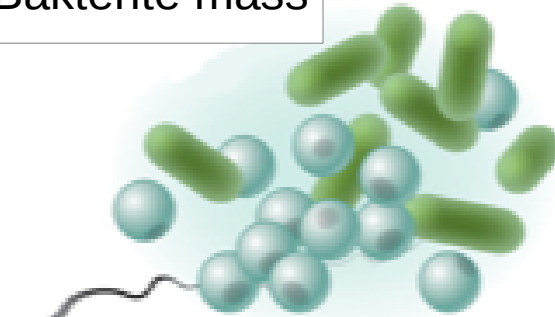
- Uuritav DNA ala on kirjeldatud
- Proovide iseloom on varieeruv

PROBLEEMID

- Väikesed muutused DNA muudavad analüüsi võimatuks
- Töömahukus – üks marker-üks analüüs, kuigi on võimalik multipleximine

MIS ON SEKVENEERIMINE?

Bakterite mass



DNA eraldamine e.
ekstraheerimine

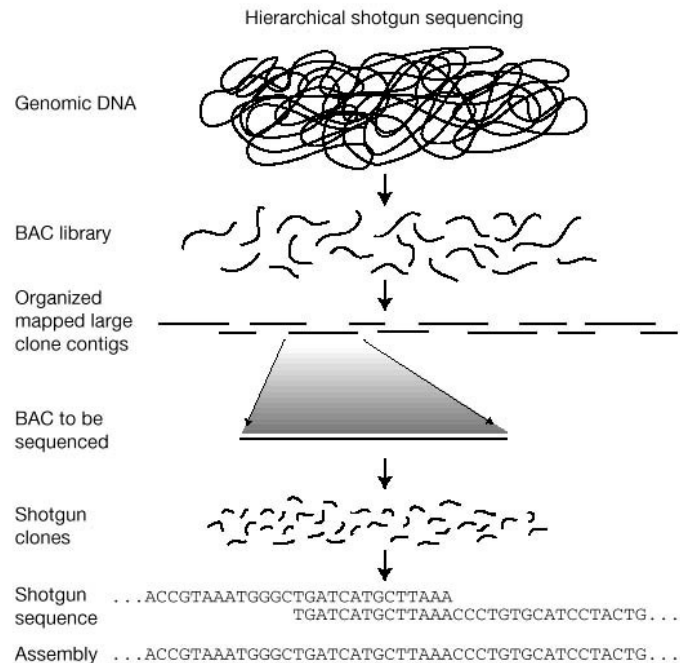
CGCAGAC...
AACTAGCA...

CGAACTAGCATTAA...
CGAAGCAGCATTAA...

DNA nukleotiides järjestuse -
aluspaaride määramine
- sekveneerimine

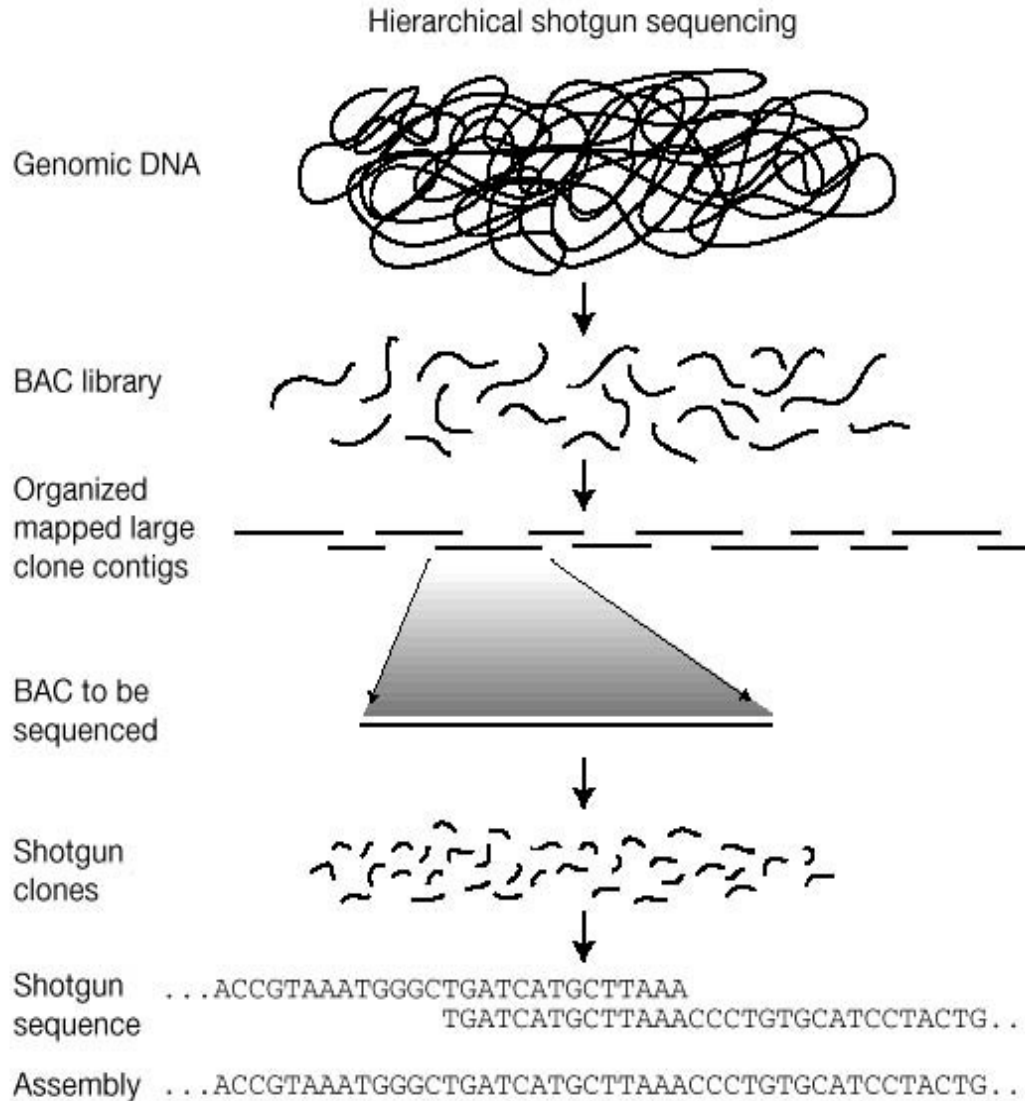
Skvenerimise ajalugu

- Sangeri DNA sekveneerimise tehnoloogia aastast 1977
- 100 kuni <1000 aluspaari korruga
- “Shotgun” sekveneerimine – juhuslikult tekitatud lühikesed fragmendid sekveneeritakse Sangeriga
- Assambleerimine – Sangeri sekventsides kokku panek ja seejärel saadud fragmentide ühendamine



Lühidalt (bakterite) genoomide skveneerimisest

- Sange
- 100 k
- “Shot
- lühike
- Assar
- seejä



ast 1977.

d
ja
panek ja

**TÖÖMAHUKAS
JA KALLIS!**

Täisgenoomsed järjestused

- Korruga kogu info mis peitub DNA järjestuses
- Fülogeneesi ja populatsioonide võrdlemine;
- Leida spetsiifilisi geene sealhulgas antibiootikumide resistentsusgeenid mis **on kirjeldamata**;
- **Uuritav organism peab olema isoleeritav!**

Teise põlvkonna sekveneerimine

- Palju, kordades rohkme kui Sanger, sekventse mis on veel lühemad!



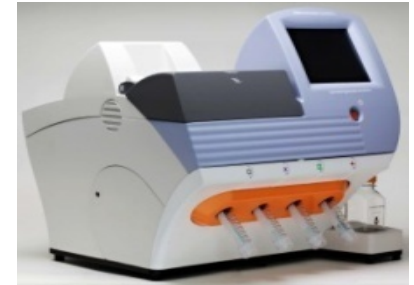
Illumina



**ABI's
Solid**



**Roche's 454
FLX**



**Ion
torrent**



**Pacific
Biosciences**



Väljund ja hind

Tehnoloogia	Fragmendi pikkus/ Koguväljund aluspaarides	Hind Mbp kohta	Ühe analüüsi hind
Roche 454	800 bp / 800 Mbp	10 €	~8 - 9000 €
Solid	75 bp / 600 Gbp	-	-
IonTorrent	200 bp / 0.5, 1,2,10 Gbp	0.2 – 1 €	~500 - 1000 €
Illumina - HiSeq	100(150) bp/ 70 - 90 Gbp	0.1 €	~8 - 9000 €
- MiSeq	150,250,300 bp/ 4, 8, 16 Gbp	0.25 / 0.15 / 0.1€	~ 1000 / 1200/ 1500€
Sanger		3000 €	2-4 €

On see tegelikult kallis?

- Keskmise bakteri genoom 4 kuni 6 Mbp
- Vajalik korduste arv ~ 100 x
- Üks genoom 0.4 kuni 0.6 Gbp
- ~ 100 genoomi < 60 Gbp
- 8000€ / 100 ~ 80 € genoomi kohta

Võrdne $\sim 20 - 40$ PCRi fragmendi traditsioonilise
sekveneerimisega

PHASE : INTERPRETATION
TWO :

SEDGWICK the Ledger

I THINK I FOUND A CORNER PIECE.



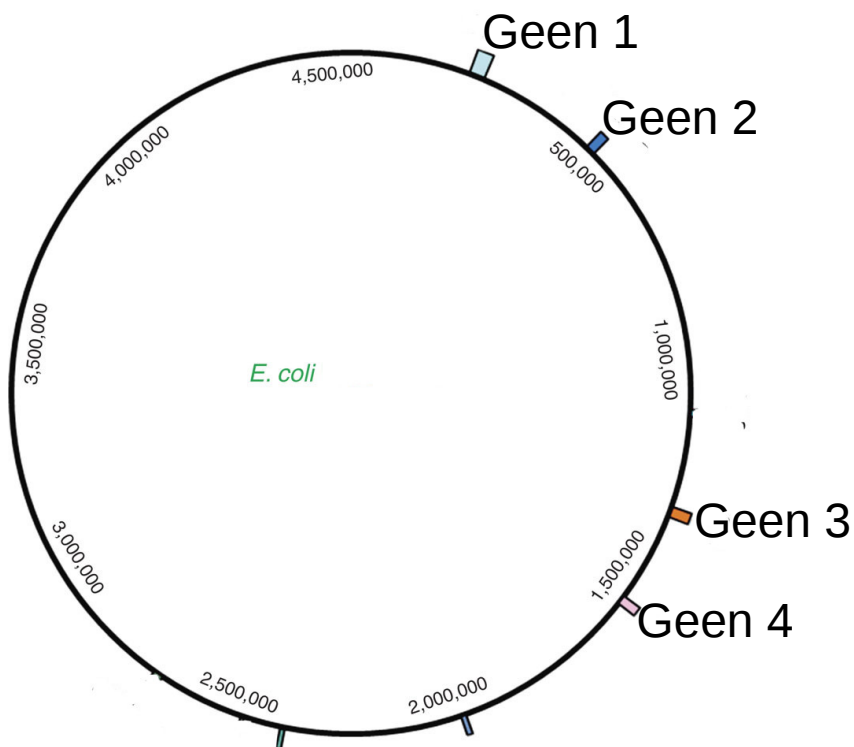
Andmete analüüs

- Andmeid korraga palju – kettaruum!
- Andmeanalüüs ei ole tavapärane – Linuxi keskkond
- Võib olla ajakulukas, protsessoritundide arv
- Assambleerimine, *de novo* või “mappimine”
 - Tulemus **ei ole** lõplikult kokkupandud genoom
 - 100d kuni 1000 pikemat fragmenti
 - N50 ~25 000 bp
 - Pikim fragment 250 000 bp
- Keskmise kodeeriv ala bakteril ~1000 bp

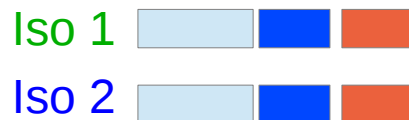
Võimalused - “all in one”

Genoomne molekulaardignostikat

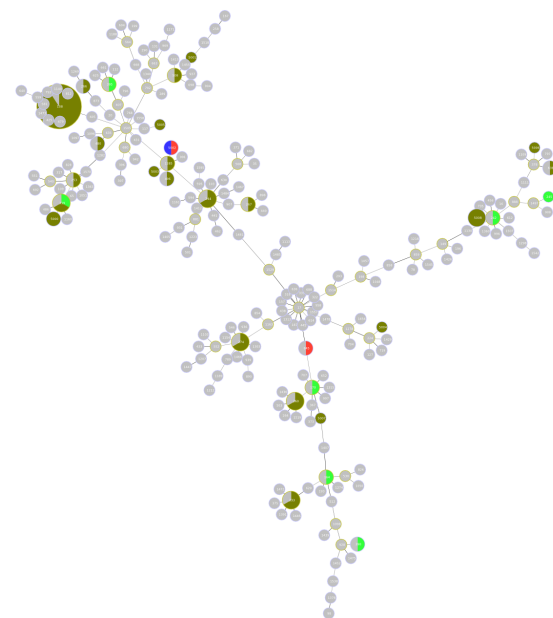
- Erinevate isolaatide ja tüvede sugulus (näiteks MLST analüüs)
- Tuntud ja tundmatute resistentsusgeenide tuvastamine



Geenide võrdlus



Suguluse võrgustik



Suguluse võrgustik

Pseudomonas aeruginosa

- 48 isolaati Eesist

Inimeselt
Koeralt
Lehmalt
Kassilt
Andmebaas

