

Genen sms'en

Single molecule Sequensen (SMS) was tien jaar geleden nog sciencefiction. Nu kunnen we zonder te PCR'en met deze technologie sequenzen, al bepaalt concurrentie met bestaande platforms de verdere opmars.

ARNO VAN 'T HOOG

Het concept van single molecule sequensen lijkt even elegant als simpel: monitor de activiteit van één enkel DNA-polymerase, terwijl het enzym fluorescerende nucleotiden inbouwt. Op die manier kun je de basenvolgorde van DNA-moleculen bepalen, zonder ingewikkelde voorbereiding.

TRISOMIE 21

Onder leiding van Elles Boon, klinisch moleculair geneticus in het LUMC, beproefde een onderzoeksteam in 2012 en 2013 de technologie voor diagnostiek van het Downsyndroom, ofwel trisomie 21. In het bloed van een zwangere vrouw komt celvrij DNA van de foetus voor. Door dit te sequensen kun je uit de hoeveelheid DNA afkomstig van chromosoom 21 opmaken of de foetus een verhoogde kans op Downsyndroom heeft.

De belangrijkste reden om SMS te gebruiken is volgens Boon omdat er een PCR-stap voorafgaand aan de DNA-analyse ontbreekt, die gebruikelijk is bij andere sequencingtechnologieën. "Als je zo'n vermenigvuldigingsstap weglaat scheelt dat tijd. Bovendien levert de amplificatie foutjes op, die tijdens het aflezen voor problemen kunnen zorgen. Vooral GC-rijke gebieden kunnen voor onevenwichtige amplificaties zorgen. Dat zorgt voor extra ruis in je data, terwijl je op zoek bent naar een maar subtiel signaal van DNA afkomstig van een extra chromosoom bij de foetus."

Boon vergeleek de SMS-technologie van fabrikant Helicos met de veelgebruikte

sequencingtechnologie van Illumina. De single molecule-benadering bleek inderdaad beter te werken: DNA van trisomie-21-foetussen kon ze duidelijker onderscheiden van normale foetussen, doordat er geen GC-bias in de sequentiedata zat. Boon: "Ik vond de resultaten zeker veelbelovend, maar toch zijn we deze technologie niet in de klinische diagnostiek gaan gebruiken. Het platform werd niet goed ondersteund door Helicos, en dat moet wel wanneer je betrouwbare diagnostiek wilt bieden. We corrigeren nu de GC-bias met data-analyse. Dat werkt ook."

'Er zit geen GC-bias in de sequentiedata'

Pionier op SMS-gebied, Helicos, is inmiddels failliet, concurrent Pacific Biosciences (PacBio) levert echter nog wel SMS-sequencers. Ook PacBio's technologie kijkt naar individuele DNA-moleculen, maar is in technologische uitvoering niet vergelijkbaar. PacBio's apparaat kan bovendien veel langere stukken DNA achtereen uitlezen, tot wel twintigduizend basen, in tegenstelling tot zo'n dertig basen bij Helicos.

Sequensservicebedrijf Baseclear in Leiden biedt sinds anderhalf jaar sequensen aan met een PacBio-apparaat. Ook hier is het achterwege blijven van PCR

een voordeel, aldus Aldalberto Costessi, Baseclears manager next generation sequencing. "Belangrijker is dat we heel lange reads kunnen produceren, ook van moeilijke gebieden met veel repeats, die je met korte reads op de Illumina soms moeilijk in kaart kunt brengen. Zo'n lange read op de PacBio dient dan als *scaffold* of mal voor de korte reads op de Illumina. Op die manier combineren we beide technieken om sneller een compleet genoom in kaart te brengen."

Je kunt ook een compleet bacteriegenoom in kaart brengen met single molecule sequencing, aldus Costessi. "Maar de kosten daarvan zijn voor ons hoger dan de combinatie van de twee technieken."

METHYLERING

Op dit moment bepaalt de levensduur van het DNA-polymerase nog de maximale read-lengte van tien- à twintigduizend basen, meent Costessi. Het enzym raakt namelijk beschadigd door het laserlicht dat de synthetische nucleotiden laat fluoresceren. Nieuwe 'kits' van PacBio kunnen volgens de fabrikant readlengtes opleveren van ruim 40.000 basen.

SMS heeft nog een heel interessante extra eigenschap volgens Costessi. "Je kunt uit een kleine vertraging van de sequensreactie afleiden of een base gemethyleerd is. Je krijgt dus bovenop de basenvolgorde de methylatietoestand van het DNA er gratis bij."

