



TP53 gén szekvenálása nanopore technológiával vastagbél-daganatban



DÁVID Adrienn-Dorisz¹, Dr. KOVÁCS Zsolt²

¹ Babeş–Bolyai Tudományegyetem, Biológia és Geológia Kar, 400015, Cluj-Napoca, Str. Republicii nr. 44.; e-mail: david.adrienn1@gmail.com

² Marosvásárhelyi George Emil Palade Orvosi, Gyógyszerészeti, Tudomány és Technológiai Egyetem, Biokémia és Környezeti Kémia Tanszék, 540142, Marosvásárhely, Románia

Bevezetés

- Az új-generációs szekvenálás négy alapvető lépésre osztható: DNS extrakció, könyvtárkészítés, szekvenálás, adatok elemzése.
- Jelen kutatás során a TP53 tumorszupresszor gén szekvenálását vizsgáltuk vastagbél-daganat mintákból.
- A 24 vizsgált mintából 8 esetben azonosítottunk mutációt – 5 esetben már leírt mutációról van szó, amelyek megjelennek a The Cancer Genome Atlasban.

Könyvtárkészítés

Native Barcoding Kit 24 V14 (Oxford Nanopore Technologies)

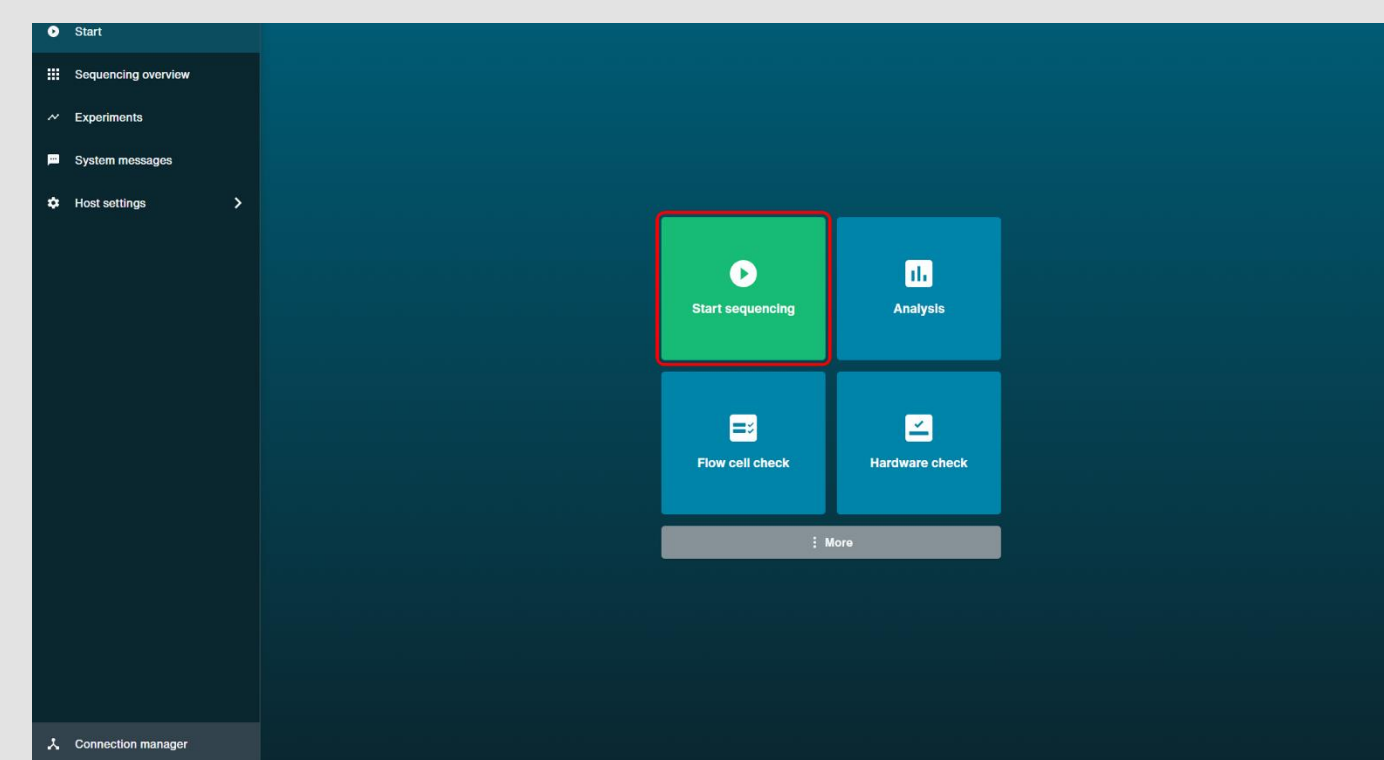
ID	Egyenes irányú szekvencia (forward sequence)	Fordított irányú szekvencia (reverse sequence)
NB01	CACAAAGACACCGACAACCTTCTT	AAGAAAGTTGTCGGTGTCTTTGTG
NB02	ACAGACGACTACAACCGAATCGA	TCGATCCGTTTGTAGTCGCTGT
NB03	CCTGGTAACTGGGACACAAGACTC	GAGTCTTGTGTCCAGTTACCAGG
NB04	TAGGGAAACACGATAGAATCCGAA	TTCGGATTCTATCGTGTTCCTA

Szekvenálás és bázishívás

- SpotON áramlási cella előkészítése illetve a könyvtár betöltése



- A bázishívás folyamata a MinKnow bázishívó szoftverrel valósult meg.



Szekvenálás során azonosított mutációk

Esetszám	Mutáció	Pozíció	rsID
1	X		
2	c.79C>T	p.P27S	-
3	X		
4	X		
5	X		
6	X		
7	c.847C>T	p.R283C	rs149633775
8	X		
9	X		
10	c.266C>T	p.P89L	rs730881994
11	X		
12	c.519G>A	p.V173V	-
13	c.586C>T	p.R196	rs397516435
14	X		
15	X		
16	X		
17	c.749C>T	p.P250L	-
18	X		
19	c.524G>A	p.R175H	rs28934578
20	X		
21	X		
22	X		
23	c.1014C>T	p.F338F	rs150293825
24	x		

DNS izolálás

A DNS izolálása a mintákból kisózással (salting out) történt.



Reagensz és eszközök



The Cancer Genome Atlas

rsID	Mutációhoz köthető betegség
rs149633775	Li-Fraumeni szindróma
rs730881994	Li-Fraumeni szindróma
rs397516435	örökletes rákra hajlamosító szindróma (Hereditary cancer-predisposing syndrome)
rs28934578	Li-Fraumeni szindróma
rs150293825	örökletes rákra hajlamosító szindróma (Hereditary cancer-predisposing syndrome)

Összefoglalás

- Főbb előnyei a MinION (Oxford Nanopore Technologies) szekvenátornak: **kis méret, költséghatékonyság, valós időben történő adatelemzés, nagyon hosszú szekvenciák meghatározásának** a lehetősége.
- Jelen kutatás eredményeiből arra következtettünk, hogy a szekvenátor nem csak kutatásban előnyös, hanem **klinikai laboratóriumokban is diagnosztikai előnyt** képviselne.