

Sekvenování další generace (*Next generation sequencing*)

Sekvenování další generace je vynikající nástroj, který umožňuje sekvenovat buď celý genom, nebo jeho části, které jsou v dané chvíli předmětem studia. Jednou z možností je sekvenace části genomu, která se přepisuje na proteiny, tzv. exomu. Exomové sekvenování má tu výhodu, že je levnější a může být důkladnější. Přitom stále umožňuje hledat mutace, které jsou důležité při vývoji a léčbě různých onemocnění.

Princip této metody spočívá v hrubém naštěpení DNA například pomocí ultrazvuku. Tímto způsobem získáme spoustu štěpů, které ale nemají zarovnané konce dvoušroubovice – mohly by se tedy časem znovu „slepit“. Z tohoto důvodu se přidávají nukleázy, které konce štěpů zarovnají. Dochází tak sice ke ztrátě části informace, ale vzhledem k tomu, že se takto lyzuje vždy větší množství buněk, je velká pravděpodobnost, že se každá molekula DNA rozštěpí na jiném místě. Samotná sekvenace pak probíhá různými mechanismy, přičemž každý výrobce používá jiný mechanismus sekvenování. Jednou z možností je rozdělit molekuly DNA přidáním oleje do malých kapiček tak, že v každé kapičce je právě jeden štěp DNA. Vlastní sekvenace pak probíhá metodou pyrosekvenování, kdy DNA uměle replikujeme a s pomocí enzymu luciferázy vizualizujeme přidavek každé báze. Jinou možností sekvenování je navázání štěpů DNA na podklad. K takto imobilizované DNA se opět syntetizuje další vlákno s fluorescenčně značenou bází. Každé připojení báze tak počítač zachytí a vyhodnotí. Oba tyto přístupy mají jedno společné. Umožňují záznam sekvenace spousty štěpů najednou. Celá analýza se tak významně zkracuje a zlevňuje proti klasickým metodám genomiky.

Sekvenování další generace se používá nejen ve výzkumných projektech, v nichž se hledají genetické poruchy zodpovědné za vývoj onemocnění, ale také v klinické biochemii pro stanovení mutačního profilu konkrétního pacienta. Při výzkumu se porovnává DNA nemocných pacientů s referenční DNA vytvořenou průměrováním zdravých jedinců. Získané genetické mutace se poté musí vyhodnotit, jestli jde o tzv. vedoucí mutaci, nebo následnou mutaci. Vedoucí mutace je ta, která je primárně zodpovědná za onemocnění. Následné mutace se vyskytují až v nemocné tkáni jako následek snížené kontroly buňky. V klinické biochemii se také hledají mutace nemocného pacienta, ovšem za jiným účelem. Některá cílená léčiva jsou zaměřena pouze na mutované proteiny a na normální variantu těchto proteinů neúčinkují, jindy mutace genu použití těchto léčiv vylučuje. Tato cílená léčiva se uplatňují zejména v onkologii, kde jsou mutační profily některých nádorů dostatečně známy. Vzhledem k vysoké ceně cílené léčby je velmi přesná diagnostika pacienta nutnou podmínkou pro předepsání takové léčby.

Obr. 1 NGS Illumina: Příklad pro sekvenování další generace firmy Illumina

