

Druga generacija sekvenciranja omogućava dekonvoluciju mješavina mtDNA i visoku rezoluciju otkrivanja heteroplazmije

Mitchell M. Holland, Megan R. McQuillan, Katherine A. O'Hanlon

Cilj Koristiti paralelno predpripređeno pirosekvenciranje za dekonvoluciju mješavina sekvenci mitohondrijske DNA (mtDNA) i napraviti analizu visoke rezolucije heteroplazmije mtDNA.

Postupci Hipervarijabilni segment 1 (HV1) mtDNA kontrolne regije analiziran je u 30 osoba uz pomoć instrumenta 454 GS Junior. Koristili smo se probnim mješavinama da bismo procijenili sposobnost sustava da dekonvoluiraju mješavine i pouzdano odredi heteroplazmiju, uključujući razlike u heteroplazmiji između 5 članova obitelji povezanih majčinskom linijom. Sekvenciranje amplicona provedeno je produktima polimerazne lančane reakcije (PCR) stvorenim primerima koji su uključivali multipleks označivače (*multiplex identifiers*) i adaptore za pirosekvenciranje. Analiza podataka provedena je uz pomoć programa NextGENe[®]. Analiza autosomalnog kratkog udvojenog sljedovnog (STR) lokusa (D18S51) i lokusa Y-STR (DYS389 I/II) provedena je simultano s dijelom HV1 da bismo pokazali da multipleksiranje može obuhvatiti različite biljege od forenzičnoga interesa.

Rezultati Mješavine, uključujući heteroplazmijske varijante, mogu se rutinski otkrivati sve do omjera komponenti od 1:250 (20 kopija sitnih varijanti sa stopom pokrivanja 5000 sljedova), a može se otkrivati i do omjera od 1:1000 (0,1%) s proširenom pokrivenošću. Sljedovi amplicona s D18S51, DYS389 I/II, i druge polovine HV1 uspješno su razdijeljene i analizirane.

Zaključak Sposobnost da se rutinski dekonvoluiraju mješavine mtDNA do omjera 1:250 omogućuje visoku rezolucijsku analizu heteroplazmije mtDNA i diferencijaciju osoba povezanih majčinskom linijom. Pirosekvenciranje za posljedicu ima malu rezoluciju homopolimeričkih sljedova, a artefakti PCR/sekvenciranja zahtijevaju mehanizam filtriranja sličan onome za STR smetnje. Osim toga, mora se riješiti pitanje kimerične sekvencije iz skakajuće PCR kako bi metoda postala učinkovita.