

Neue Möglichkeiten und Herausforderungen moderner Sequenziertechnologien am Beispiel von Phytoplasmen und verwandten Bakterien

Michael Kube und Carmen Büttner, FG Phytomedizin,
ADTI, Humboldt-Universität zu Berlin

Abstract

Amplicon-Libraries sowie die massive Parallelisierung von Sequenzierreaktionen kennzeichneten die erste Generation der modernen Sequenziertechnologien wie die Pyro-Sequenzierung (454 Life Technologies/ Roche), Sequencing by Synthesis (Solexa/Illumina) und Sequencing by Ligation (Applied Biosystems/Life Technologies). In der experimentellen Durchführung einfache Systeme wie die Semiconductor Technology (Ion Torrent) folgten. In den letzten Jahren gelang es bei den etablierten Technologien den Probendurchsatz zu erhöhen, längere Readlängen zu erreichen, unter anderem durch sogenannte paired-end Strategien. Lange Reads von hoher Qualität eröffnen neue Möglichkeiten in der Diagnose, Genomanalyse und Transkriptomforschung und lösten den aktuellen Sequenzier- Boom aus. Tiefensequenzierungen ermöglichen die Identifizierung und Analyse von Pathogenen wie Phytoplasmen in Metagenom und –transkriptomstudien. Trotz aller Fortschritte stellen noch immer hohe Kosten und zu kurze Readlängen die größten Probleme in der Sequenzanalyse dar. Neue Methoden wie das Single Molecule Real Time (SMRT) Sequencing (Pacific Biosciences) ermöglichen auf Grund der Leseweiten von mehreren Kilobasen hier die Analyse von nicht zellfrei-kultivierbaren Pathogenen. Vorteile wie die Vermeidung von fehlerhaften Zuordnungen, Konflikte beim Assemblieren, Deep Cluster Bildung werden hierbei weitestgehend vermieden und ermöglichen höherwertige Ergebnisse und eine deutlich vereinfachte Datenanalyse in der Diagnostik und der Analyse von Metagenomdaten. Bei der Rekonstruktion von Genomen der Achleplasmen und der Repeat-reichen Phytoplasmen lassen sich diese offensichtlich Vorteile stellvertretend für viele andere Anwendungen zeigen.