

שימוש בשיטות ריצוף מתקדמות לזיהוי נגיפים

נועה סלע - 28.2.2017

מהם נגיפים-ונגיפונים

1. נגיפים- גורמי מחלות הם טפילים מוחלטים ואינם תאים.

1. הם בנויים מחומצת גרעין RNA או DNA עטופה במעטפת חלבונית בעלת מורפולוגיה ייחודית.

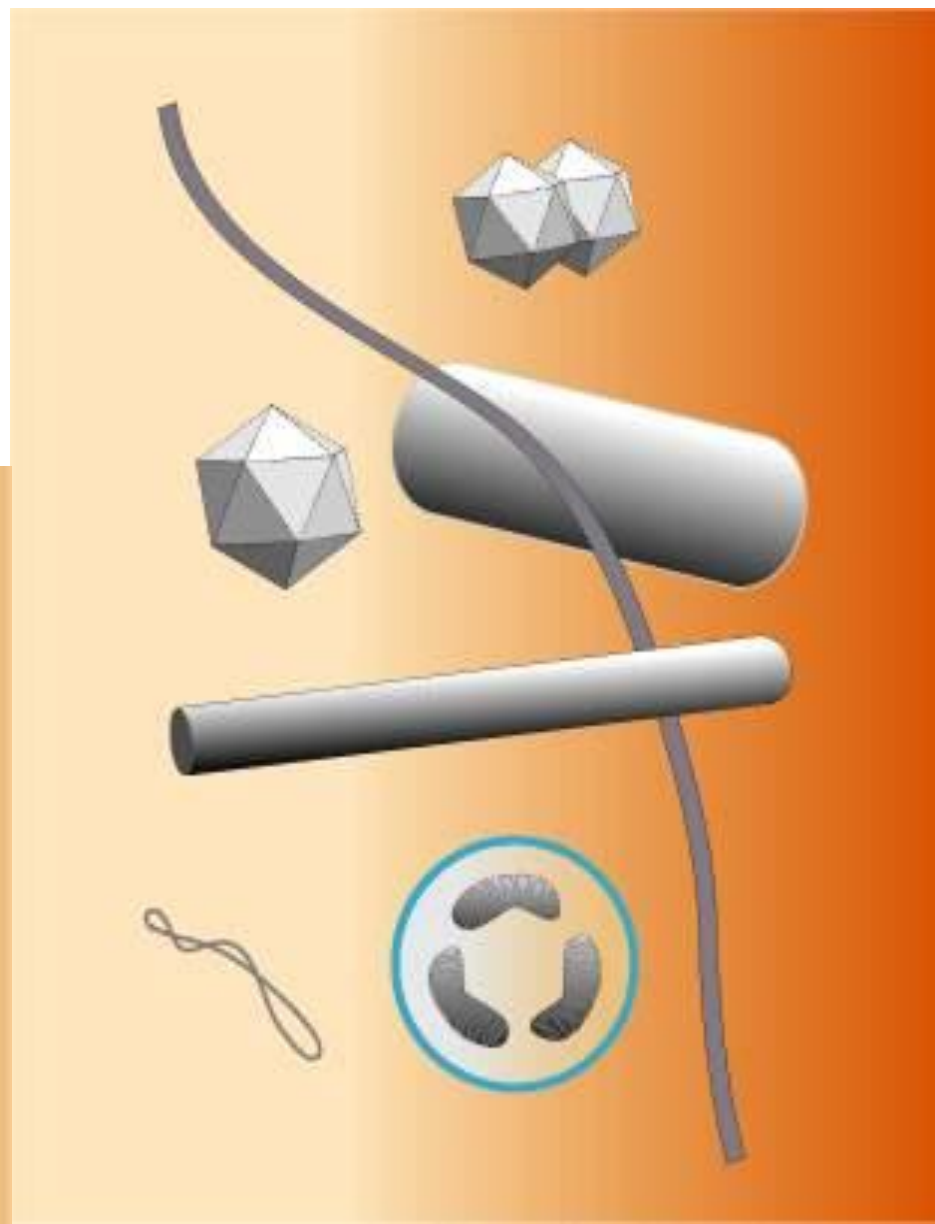
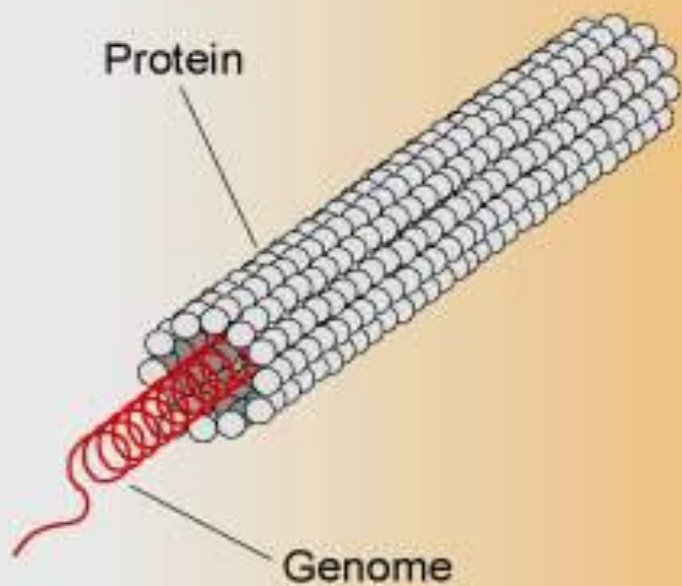
2. נגיפים מתקיימים כפרזיטים בכל צורות החיים.

3. אולם נגיפונים הם גורמי מחלות בצמחים בלבד. בנויים מחומצת גרעין RNA חז-גדילית טבעתית בגודל של 239-401 בסיסים בלבד.

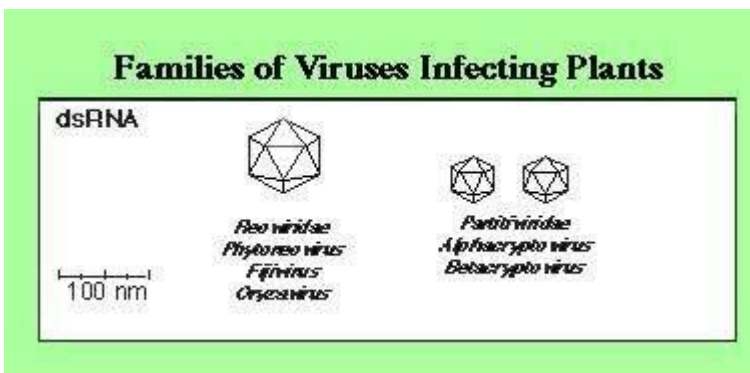
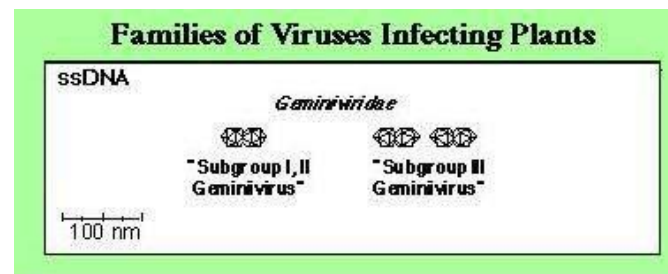
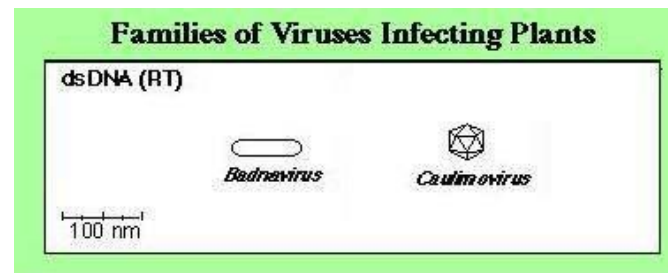
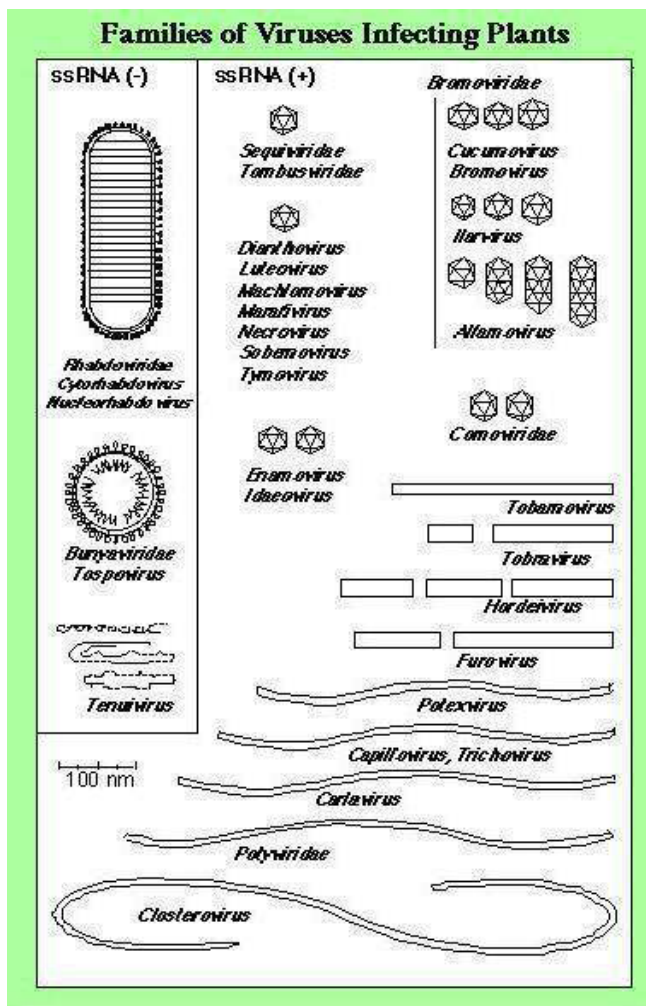
4. הגנום אינו מקודד לחלבונים.

5. ניתן לשייך את הנגיפונים לשתי משפחות עיקריות Pospiviroidae and Avsunviroidae הכוללות יותר מ-40 מינים.

חלקיקי הנגיפים באים בצורות שונות



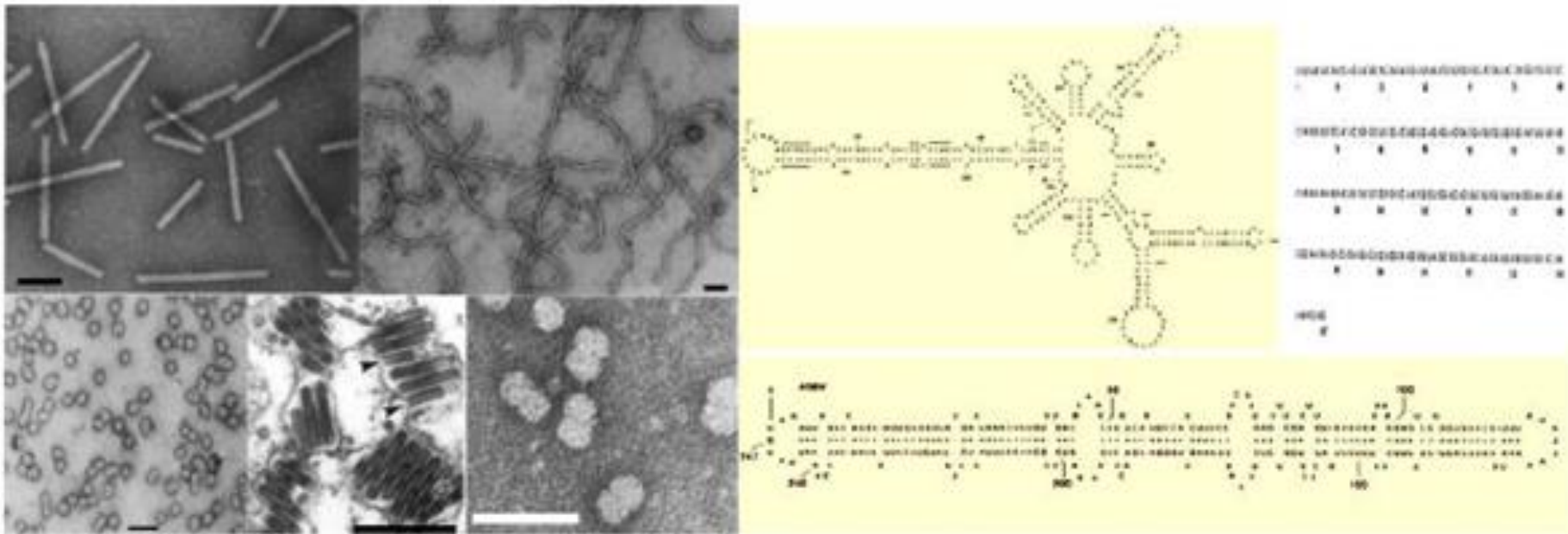
המיון של הנגיפים הצמחיים לפי משפחות, סוגים צורת החלקיק ומאפיינים של חומצת הגרעין



מכאן מידע ברמת רצף השלם של הגנום הנגיפי הוא הכרחי כדי לאפשר זיהוי ודאי ואפיון החלקים הרלבנטיים בגרומת המחלה

הגפן שיאנית עולם בדיווחים על גורמי מחלות נגיפיות ודמוי נגיפיות

נכון עד ל- 2006 יותר מ-70 גורמי מחלות נגיפיות ודמוי נגיפיות ידועים:
א. 58 נגיפים.
ב. 5 נגיפונים.
ג. 8 פיטופלסמה.



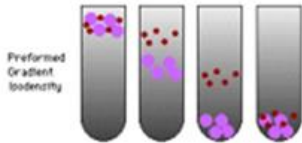
Source:

Descriptions of Plant Viruses

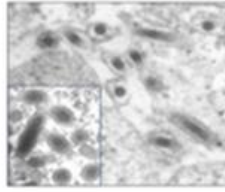
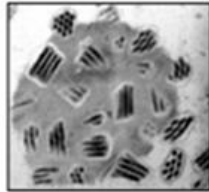
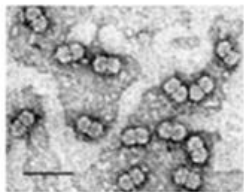
על מנת ליצור תשתית ידע (ברמת רצף גנום שלם) לנגיף בודד נדרש מאמץ מחקרי של מספר שנים-נכון עד לפני 30 שנה



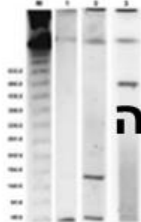
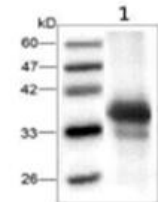
1. איסוף דוגמאות מגפנים עם תסמינים: הכנת קלף ירוק מזמורות ו/או פטוטרות עלים סימפטומטיות



2. ניקוי וירוסים באמצעות אולטראצינטריפוגה בתוך מפל צפיפות מלחי



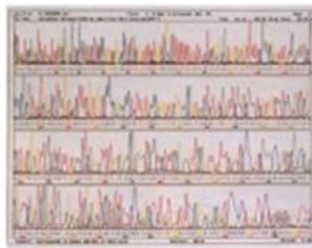
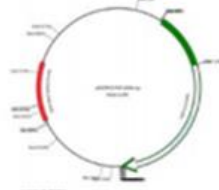
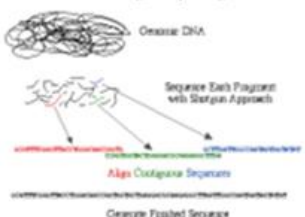
3. הכנת תכשיר ויראלי מנוקה והסתכלות במיקרוסקופ אלקטרוני.



4. ניקוי RNA או DNA מחליקיקים מנוקים והפרדה בג'ל- קביעת גודל הגנום

זיהוי חלקיקי וירוס- אבחון מורפולוגי

Whole Genome Shotgun Sequencing Method



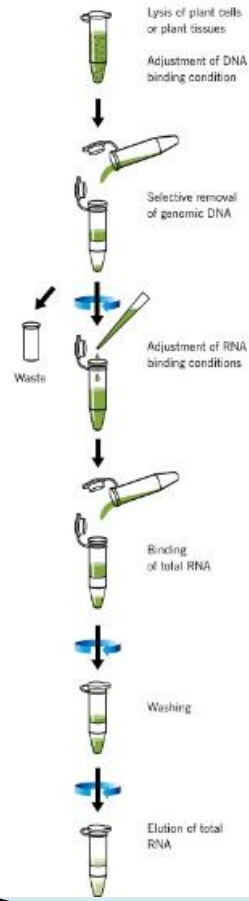
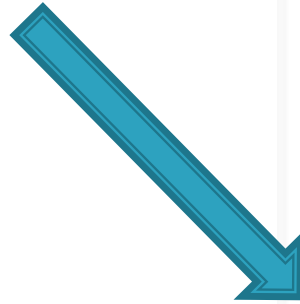
5. שיבוט מקטעים מהגנום וריצוף שבטים בהדרגה.

6. ניתוח רצפים ובניית רצף שלם לגנום

עד 2009 בכדי ליצור תשתית ידע (ברמת רצף גנום שלם) לנגיף בודד נדרש מאמץ מחקרי הנמשך מספר



1. איסוף דוגמאות מגפנים עם תסמינים: הכנת קלף ירוק מזמורות ו/או פטוטרות עלים סימפטומטיות



2. הפקת DNA או RNA כללי מהרקמה הצמחית

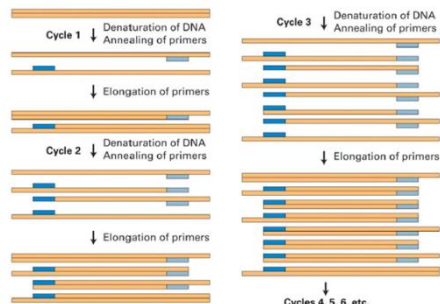
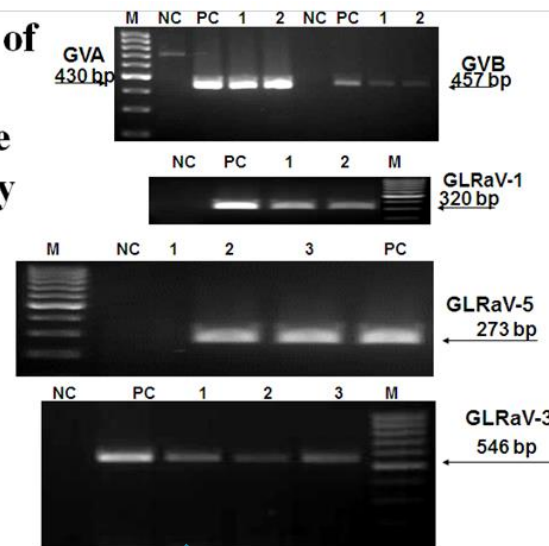


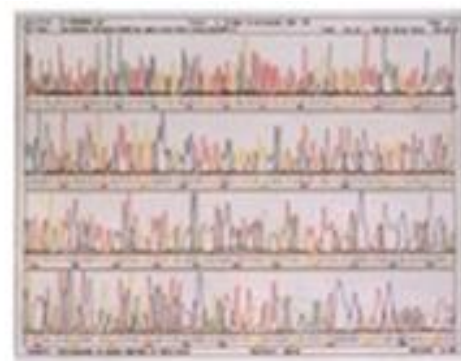
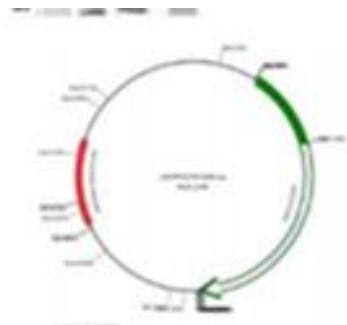
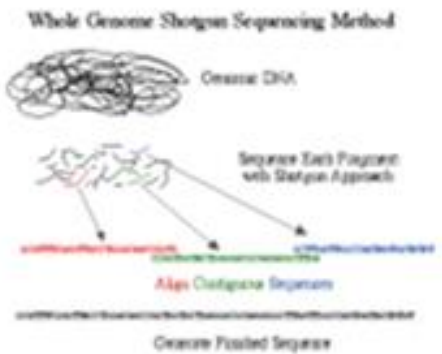
Table 18.5 Number of copies of DNA fragment in PCR amplification

Number of PCR Cycles (n)	Number of Double-Stranded Copies of Original DNA (2 ⁿ)
0	1
1	2
2	4
3	8
4	16
5	32
6	64
7	128
8	256
9	512
10	1,024
20	1,048,576
30	1,073,741,824

Detection of several Grapevine Viruses By RT-PCR



3. הגברה אנזימטית של מקטע ספציפי מגנום הנגיף באמצעות PCR



4. שיבוט תוצרי PCR או חיתוך הפס ישירות מהג'ל.

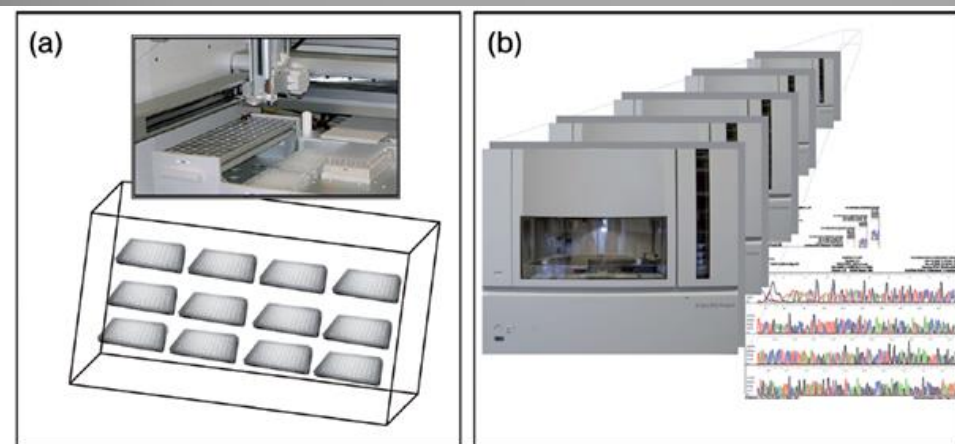
5. ריצוף בשיטת Sanger.

6. השלמת הרצף למקטעים נוספים שיוגברו בתוספת תחלים חדשים עד לקבלת הרצף השלם- חזרה על שלבים 3-5

ומאז 2009 עד היום בעידן ה-Omics

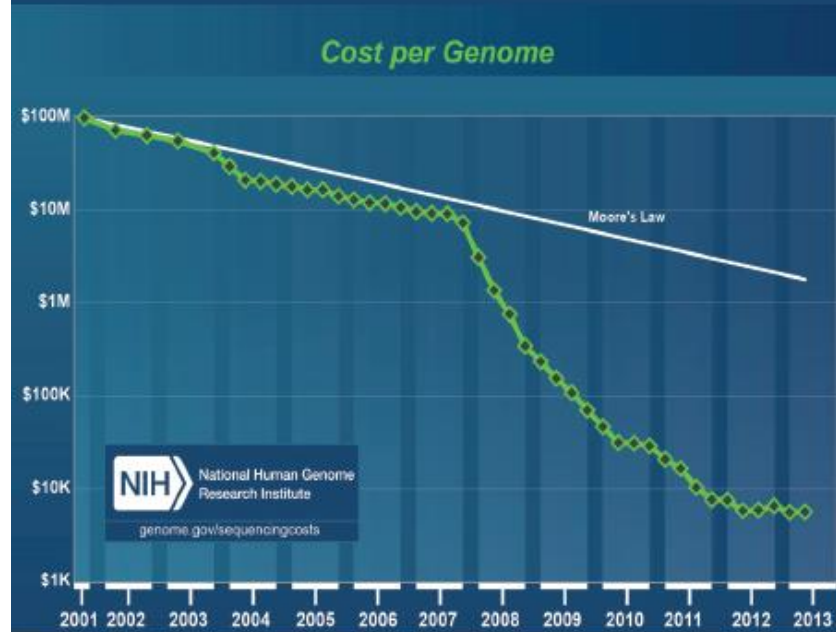
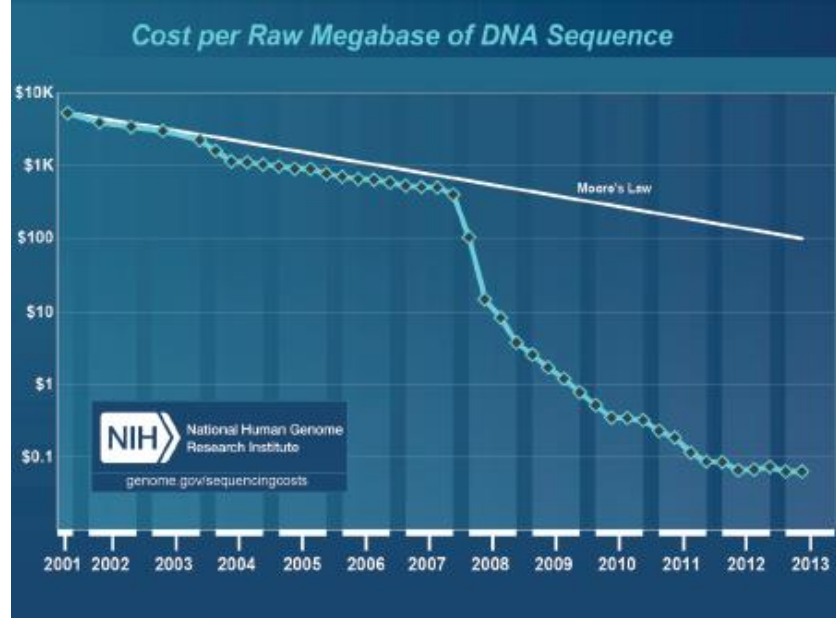
מאפשרות קבלת NGS טכנולוגיות
תשתית מידע על גנומים כמעט שלמים
של כל הרצפים הנגיפיים, והדמוי נגיפיים
בדוגמה אחת וגם בו זמנית ממספר
דוגמאות יחד

פיתוח טכניקת הריצוף בנפח גבוה התחיל כמענה –
לצורך להרצפת גנומים שלמים של בני אדם, בעקבות
פרויקט הגנום האנושי שעלה כ- 3.3 מליארד דולר
ובמשך 10 שנים



Automatic Sequencing and Computing

העלות כצפוי יורדת עם הזמן. כיום ניתן לרצף גנום שלם של אדם ב 1000 דולר. העלות צפויה לרדת עד מספר מאות דולרים בלבד.



הרעיון המרכזי בפיתוח טכנולוגיות ה-NGS עומד על העיקרון: במקום לרצף מולקולות זהות של שבת הומוגני בהרצה נפרדת מבצעים הרצפה של מיליוני מולקולות קצרות במקביל (Massively Parallel Sequencing)

Different platforms

- 454 Sequencing / Roche
 - GS Junior System
 - GS FLX+ System
- Illumina (Solexa)
 - HiSeq System
 - Genome analyzer IIX
 - MySeq
- Applied Biosystems - Life Technologies
 - SOLiD 5500 System
 - SOLiD 5500xl System
- Ion Torrent - Life Technologies
 - Personal Genome Machine (PGM)
 - Proton
- Helicos
 - Helicos Genetic Analysis System
- Pacific Biosciences
 - PacBio RS
- Oxford Nanopore Technologies
 - GridION System
 - MinION

Next Generation Sequencing
Amplified Single Molecule Sequencing

Third Generation Sequencing,
Next Next Generation Sequencing,
Single Molecule Sequencing

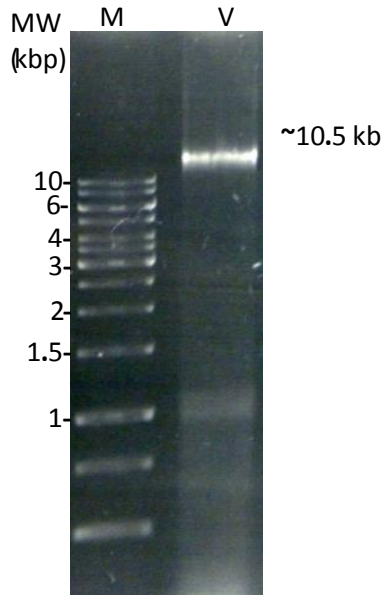
קיימות מספר פלטפורמות לריצוף

Current major methods of next-generation DNA sequencing technologies.

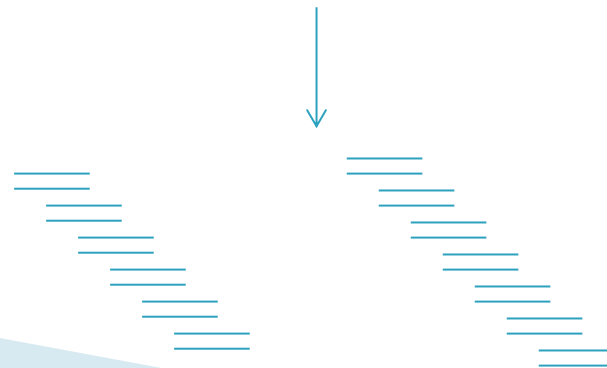
Sequencing platform	Amplification method	Sequencing chemistry	Read length (bp)	Sequencing Speed/h	Maximum Output Per run	Accuracy (%)	M ¹ I ² D ³
454 (Roche)	Emulsion PCR	Pyrosequencing	400–700	13 Mbp	700 Mbp	99.9	0.10, 0.3, 0.02 [23]
Illumina (Illumina)	Bridge PCR	Reversible terminators	100–300	25 Mbp	600 Gbp	99.9	0.12, 0.004, 0.006 [23]
SOLiD (Life Technologies)	Emulsion PCR	Ligation	75–85	21–28 Mbp	80–360 Gbp	99.9	Error is higher than Illumina [24]
PacBio (Pacific Biosciences)	No amplification Single molecule real-time (or SMRT)	Fluorescently labeled nucleotides	4,000–5,000	50–115 Mbp	200 Mb–1 Gbp	95	1, 2, 12 [25]
Helicos (Helicos Biosciences)	No amplification Single molecule	Reversible terminators	25–55	83 Mbp	35 Gbp	97	Error is in the range of few percent but higher than 454 and Illumina and biased toward InDels [24]
Ion Torrent (Life Technologies)	Emulsion PCR	Detection of released H	100–400	25 Mb–16 Gbp	100 Mb–64 Gbp	99	M, 0.06, I + D 1.38 [26]
Nanopore (Oxford Technologies)	No amplification Single molecule		Very long reads up to 50 kbp	150 Mbp	Tens of Gbp	96	

M¹ = Mismatch bases; I² = Insertion; D³ = Deletion.

שיטת הריצוף העמוק (NEXT GENERATION SEQUENCING)

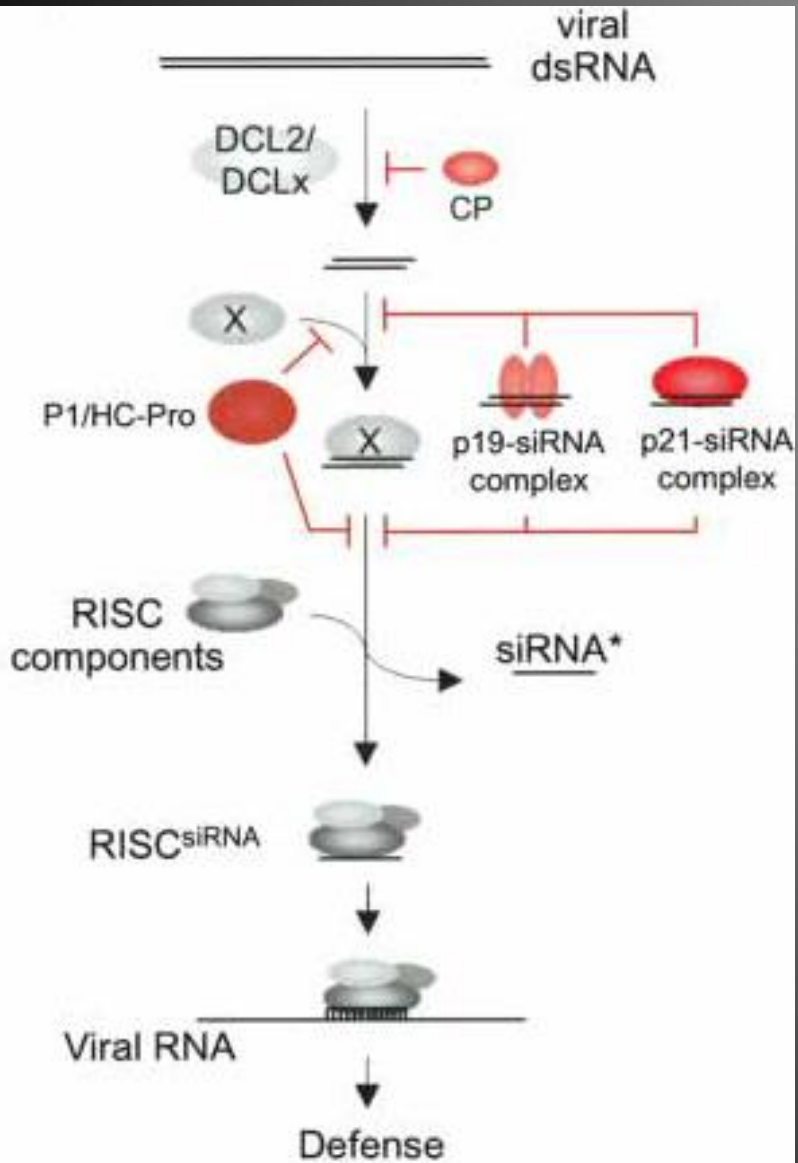
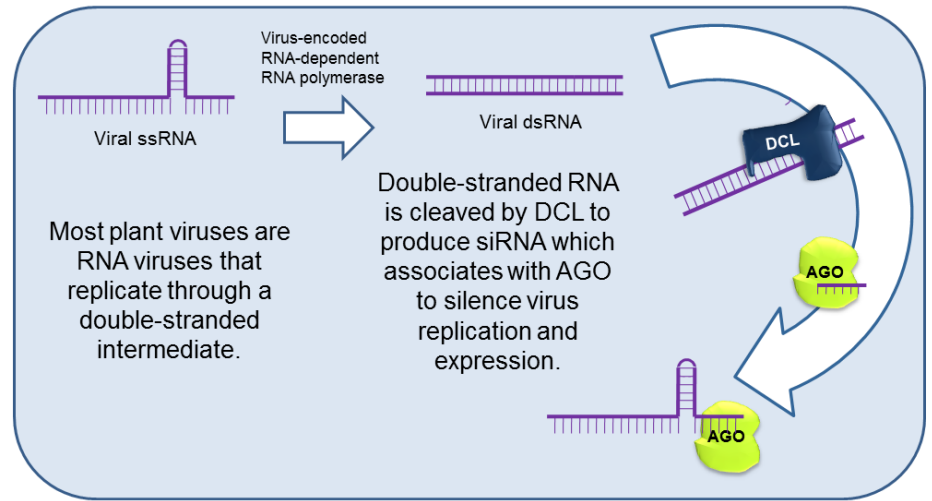


כיום קיימות מכונות המסוגלות לרצף ביעילות עשרות מיליונים של רצפי רנ"א או דנ"א המופקים מחומר חי או צומח

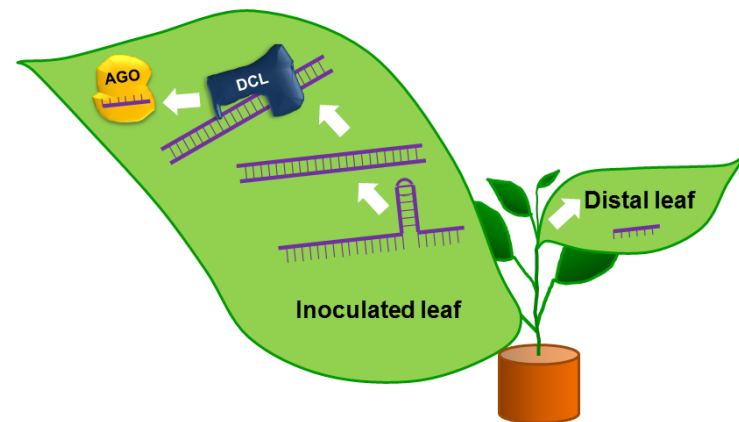


נוצרים באופן טבעי בצמח (si-RNA) small interfering RNA) כתגובה להדבקה בנגיפים ונגיפונים והם משמשים תבנית לריצוף העמוק

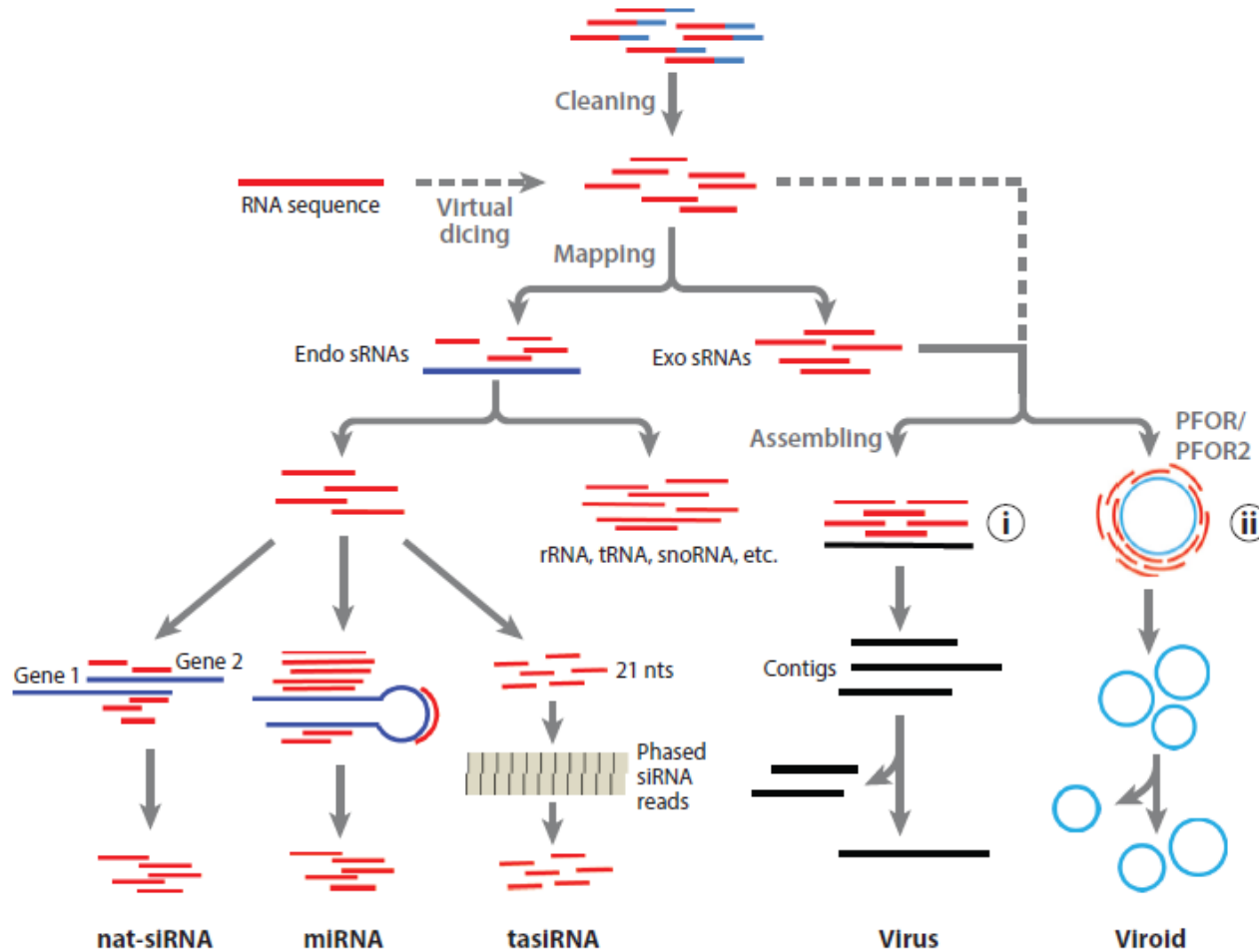
Viral induced gene silencing - overview



Virus infection causes systemic siRNA accumulation



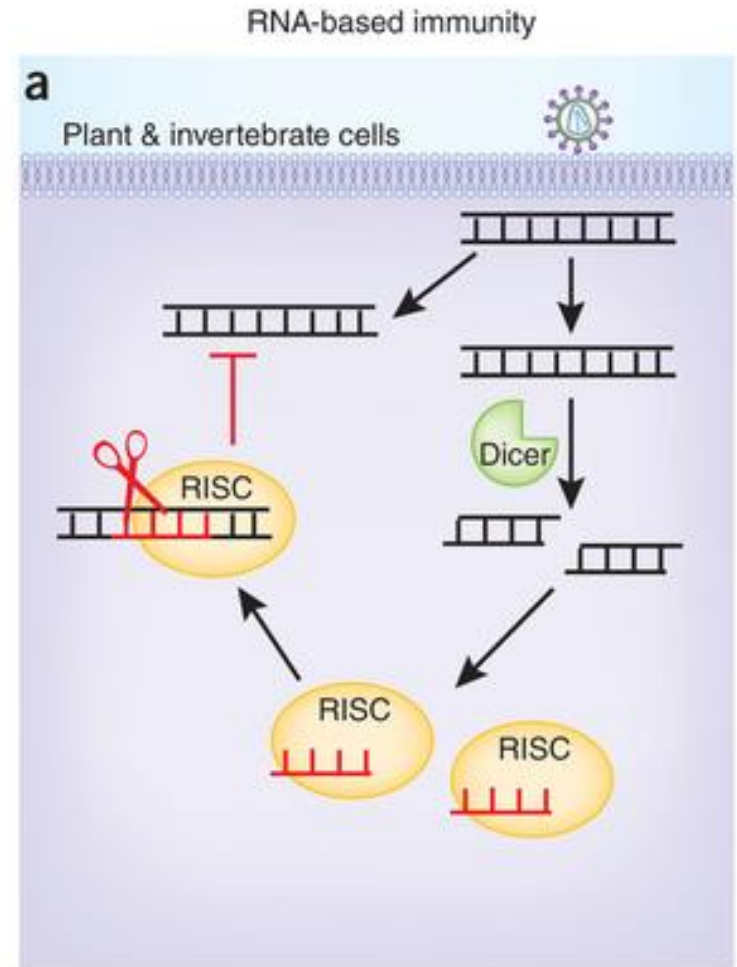
סוגים שונים של רצפים מתקבלים כאשר מרצפים small RNA מצמחים



The classification principles of endogenous and exogenous small RNAs (sRNAs) sequenced from plants in the discovery of (i) viruses by deep sequencing and assembly of total small RNAs (vdSAR) and (ii) viroids by progressive filtering of overlapping small RNAs (PFOR). Abbreviations: nat-siRNAs, natural antisense siRNAs; nt, nucleotides; tasiRNAs, trans-acting siRNAs; miRNAs, microRNAs; SLS, splitting longer reads into shorter fragments.

ניצול המערכת החיסונית של הצמח כנגד וירוסים

הצמח יודע לזהות רנ"א ממקור ויראלי ולחתוך אותו לחתיכות קטנות באורך 21-24 בסיסים אם נאסוף חתיכות קטנות אלו נקבל העשרה בחומר הגנטי ממקור ויראלי



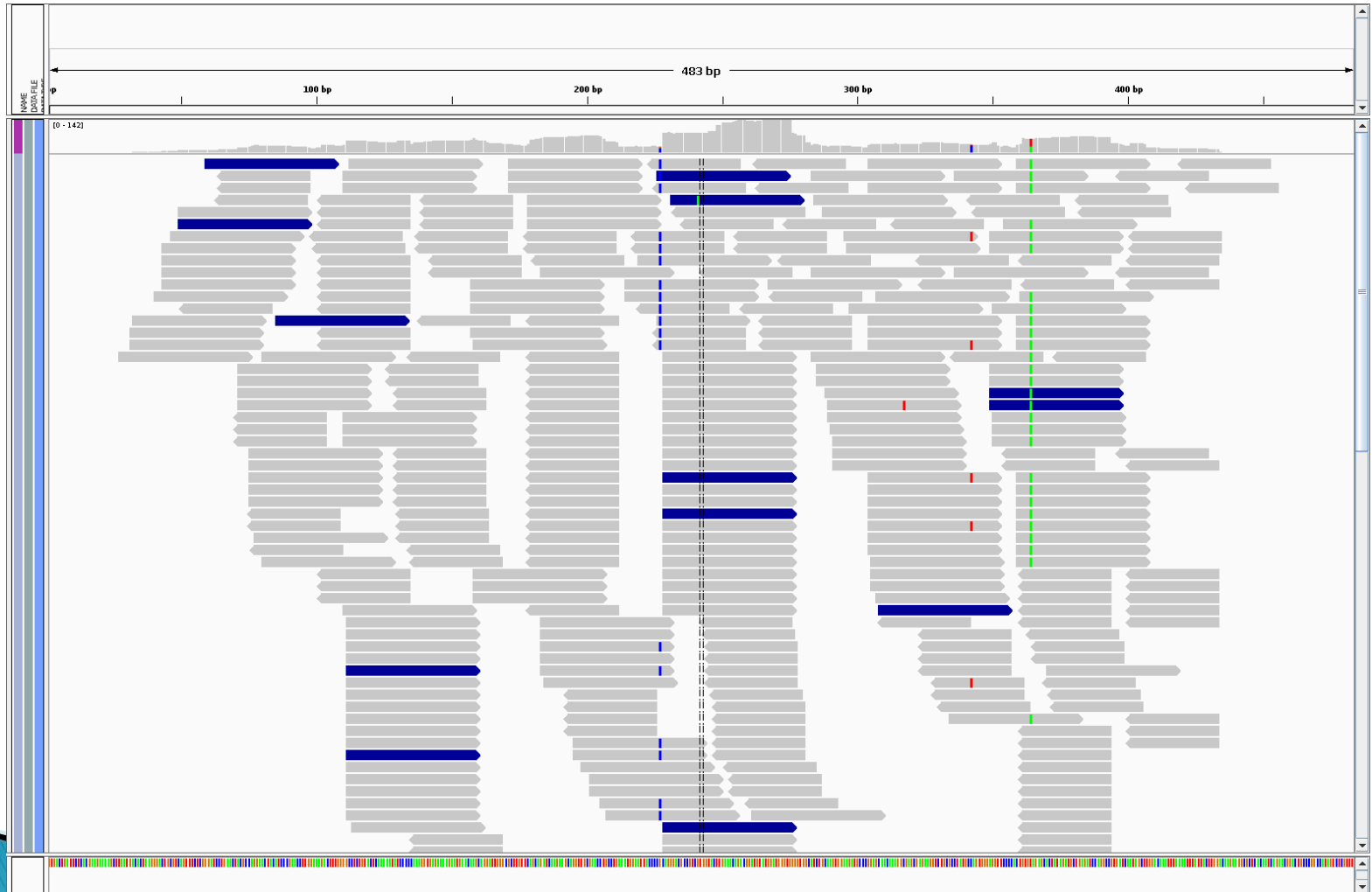
איך הריצוף עוזר לנו למצוא את הוירוס?

יש לנו 2 אפשרויות: ▶

- להניח שאנו יודעים מהו הוירוס ולנסות למצוא זהות בין הרצפים הקטנים שאספנו מהצמח לרצף של וירוס ידוע החשוד כפתוגן האחראי על המחלה
- אנחנו יכולים לא להניח כלום ולנסות למצוא את רצף הוירוס השלם מתוך חלקי הרנ"א הקטנים שאספנו

1. מיפוי הגנום הנגיפי לגנום ידוע שריצפו

פורסם



2. הרכבת הגנום הויראלי

Unknown Genome: **AGCTATAGCGCTATCGTAGCTAGCGCTAGCT**

↓ Next-generation sequencing machine

AGCTATAG	CTATAGCG
GCTAGCGC	CGCTAGCT
TCTAGCGC	CGCTATCG
AGCTAGCG	ATCGTAGG

↓ Genome assembly software

AGCTATAG	GCTAGCGC	
TCTAGCGC	AGCTAGCG	
CTATAGCG	ATCGTAGG	CGCTAGCT
CGCTATCG		

↓

Reconstructed genome : **AGCTATAGCGCTATCGTAGCTAGCGCTAGCT**

Figure 1. Workflow of discovering the genome of a species



טובמווירוס בעגבניות

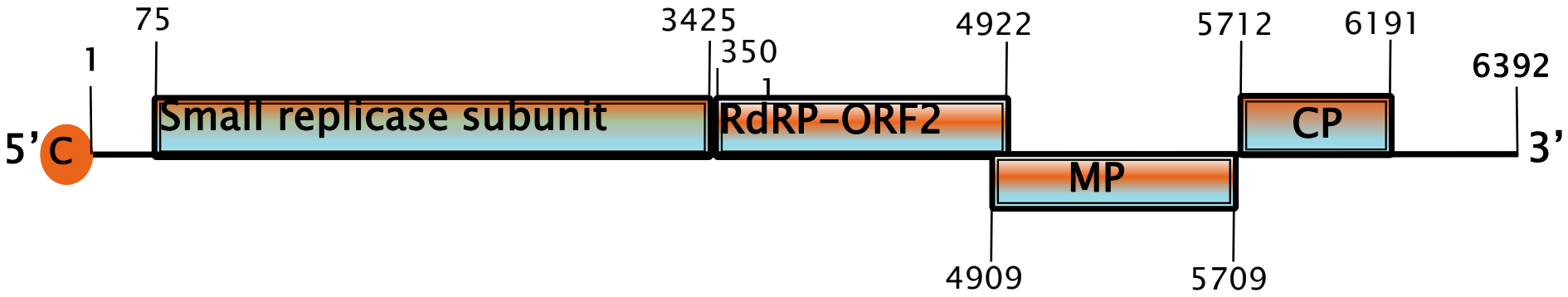


A

B

C

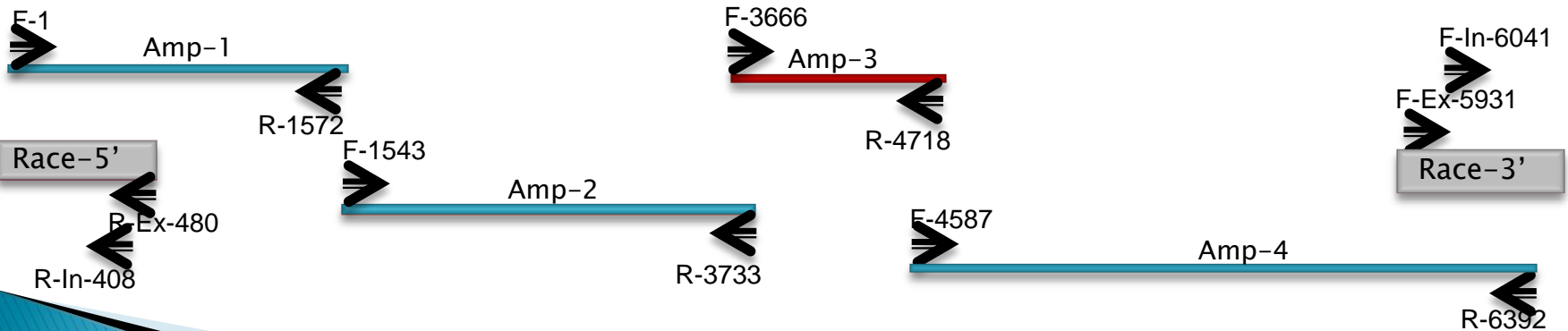
שימוש בריצוף מתקדם לזיהוי את הוירוס



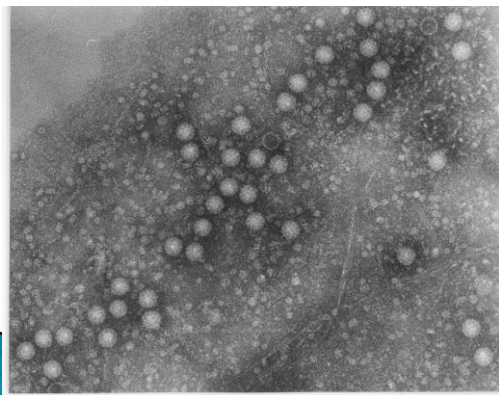
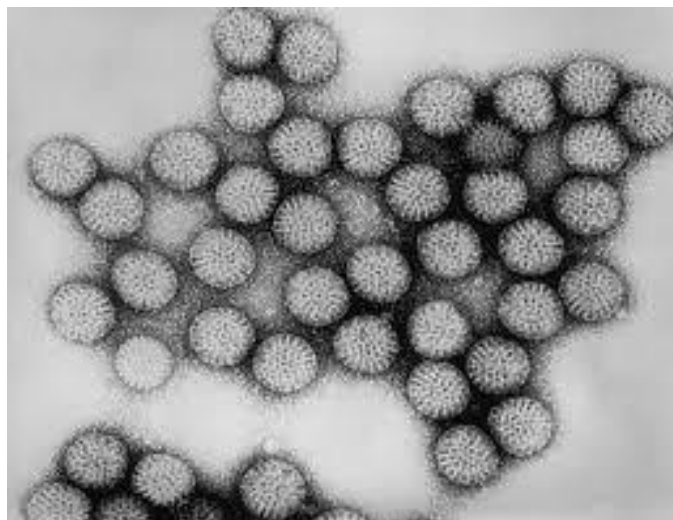
A



B



לפעמים נוכל למצוא וירוסים נוספים שכלל לא ציפינו למצוא בדוגמא



רק לאחרונה בינואר 2017 התפרסמו שני וירוסים חדשים לגמרי בגפן שנתגלו בשיטות ריצוף ב-NGS

- ▶ 1. Geminivirus A – Al Rwahnih, Maher, et al. "Description of a **Novel Monopartite Geminivirus** and Its Defective Subviral Genome in Grapevine." *Phytopathology* 107.2 (2017): 240–251.
- ▶ 2. Vargas–Asencio, José, et al. "The complete nucleotide sequence and genomic characterization of **grapevine asteroid mosaic associated virus**." *Virus research* 227 (2017): 82–87.

יתרונות הריצוף:

1. נוכל למצוא וירוסים חדשים בעלי רצף חדש שאין להם מרקרים ידועים
2. נוכל לדעת על כל הוירוסים הנמצאים בדוגמא
3. הריצוף מאפשר תכנון מרקרים לזיהוי דיאגנוסטי מהיר

תודה רבה!

