Extraktionssysteme und Referenzmaterial für NGS

Bernreiter Andreas



Next Generation Sequencing: Weiterentwicklungen der Sanger DNA Sequenzierung

Einer große Zahl von DNA-Fragmenten werden gleichzeitig sequenziert

Damit können ganze Genome innerhalb kurzer Zeit mit vertretbaren Kosten sequenziert werden.

Unterschiedliche Technologien

#### Forschung:

NGS wird mittlerweile für viele Fragestellungen in der Forschung eingesetzt, dabei wird nicht nur DNA analysiert, sondern über RNA-Analytik und weitere sogenannte "Omic"-Technologien können z.B. auch (indirekt) Genprodukte und Gen-Protein-Interaktionen untersucht werden

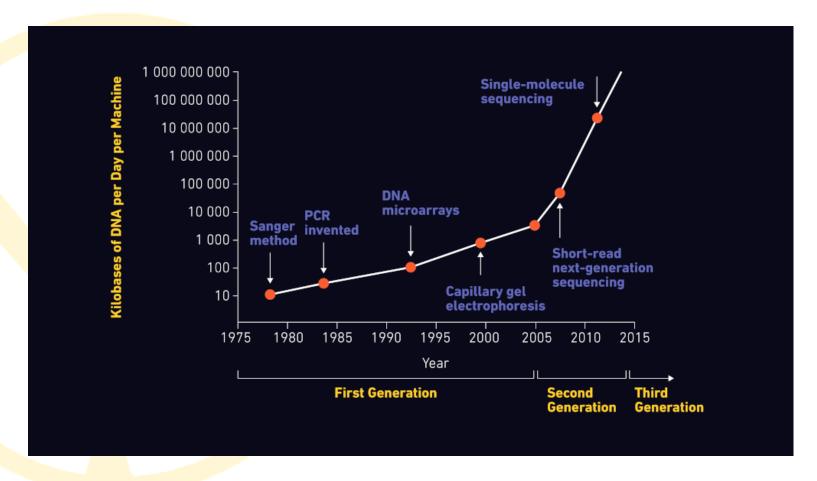
#### Klinische Anwendungen:

NGS eignet si<mark>ch s</mark>peziell für die Unters<mark>uch</mark>ung von **heterogenen Erbkrankheiten**, welche durch Veränderungen in zahlreichen Genen verursacht werden können.

Tumordiagnose, Tumorverlauf

**Nichtinvasive Pränataltests (NIPT),** genauer auch cfDNA (zellfreie DNA)-Tests genannt, sind seit 2011 klinisch verfügbar und haben die pränatale Diagnostik entscheidend verändert.





Athina Gkazi,2021



#### Sequenzierungs Generationen:

1. First Generation Sanger & Maxam Gilbert (1977) ein DNA Fragment amplifiziert -> Kettenabbruchmethode

# 2. Second Generation (um 2005 am Markt) viele DNA

Fragmente parallel sequenziert high throughput, kurze Fragmente <500bp (Short Reads), wenige Fehler -> klinische Anwendungen Illumina, Thermo Fisher Ion Torrent

Third & Fourth Generation schnell, lange Fragmente sequenziert (Long Reads), billig, fehlerhaft PacBio,
 Oxford Nanopore



**Short-Read Sequenzierung** 

Illumina; Ion Torrent

Klinische Diagnostik

aufwendige,,library preparation"

Long-Read-Sequenzierung

PacBio, Oxford Nanopore

Forschung, Genomsequenzierung

**Fehlerhaft** 



# 3 Hauptschritte bei Short Read Sequenzierungen



"library preparation"



"Sequenzierlauf"



"Bioinformatik"

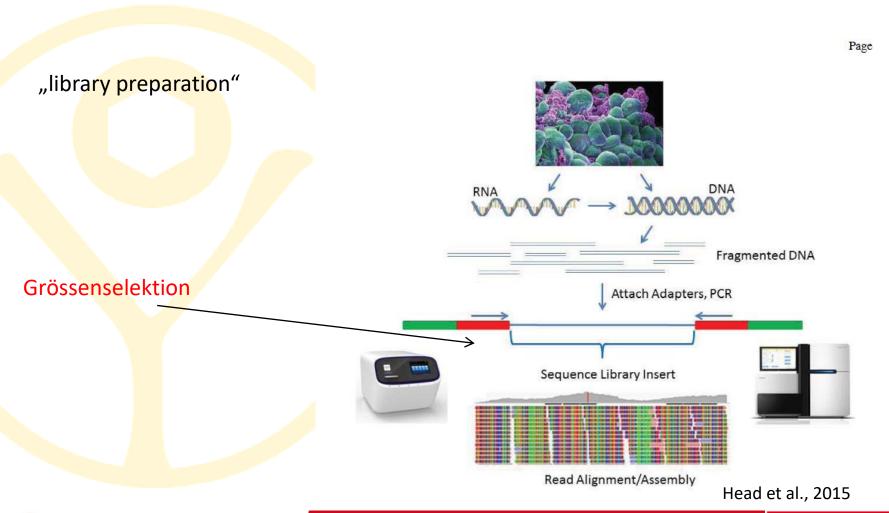




"library preparation"

- 1. DNA / RNA Extraktion
- Fragmentierung durch enzymatische oder mechanische Mittel
- **3. Endreparatur** und Prozessierung zur Homogenisierung der heterogenen Fragmentenden. (DNA repair and end-polishing (blunt-end or A-overhang)
- **4.** Adapterligation zur "Clustererzeugung" und klonalen Amplifikation in der Zelle.
- 5. Größenauswahl zum Entfernen suboptimaler Fragmentgrößen und Adapterdimere.







#### Warum?

Illumina und Ion Torrent Geräte sind meist für 200–500 bp Fragmente optimiert.

Fragmente kleiner als **150 bp** stören die Auswertung -> Adaptoren, Primer Dimere

Ab einer Länge von **500 bp** ist die Sequenzierung ineffizient und fehleranfällig

– ein Problem, das Sequenzen der dritten Generation zu lösen versuchen.



#### Welche Methoden?

#### 1. Enzymatisch

z.B Nextera Kits von Illumina. Benutzen Transposons zur Fragmentierung. Ergebnisse aber oft unzufriedenstelllend (Breite Grössenverteilung)

#### 2. Gel Elektrophorese

Sehr genaue Methode aber extrem aufwendig und Zeitintensiv

#### 3. Magnetic bead – Technologie

DNA-Fragmente der gewünschten Größe binden in Gegenwart des optimierten Puffers an die Beads. Ein Magnet wird verwendet, um die Beads/DNA zu befestigen Kostengünstig, weniger Zeitaufwendig als Gel Elektrophorese, gute Qualität

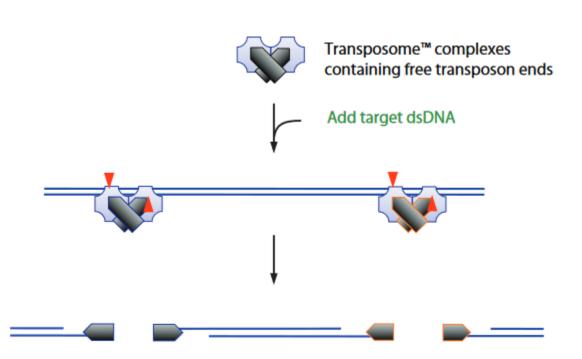


### Welche Methoden?

#### 1. Enzymatisch

Nextera Technologie verwendet
TRANSPOSASE mit 2 DNA Adaptoren

aufwendig und zeitintensiv



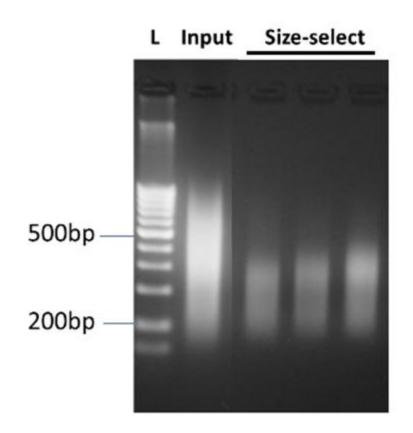
Fragmented and tagged DNA with 9-nt single-stranded gap



### Welche Methoden?

#### 2. Gel Elektrophorese

Sehr genaue Methode aber extrem aufwendig und zeitintensiv





### Welche Methoden?

3. Magnetic bead – Technologie

Sehr beliebt beí

DNA/RNA Extraktionen

Automatisch oder manuell



# Der erste vollautomatisierte Grössenselektionskit







# MagCore Size Selection für NGS

# Eigenschaften:

- 1. Automatische DNA Aufreinigung und Grössenselektion in ~ 30min
- 2. Magnetic bead Technologie
- 3. Hohe Ausbeute
- 4. Wenig Arbeitszeit
- 5. Konstant gute Qualität keine manuellen Fehler

# Anwendungen

- DNA library peparation für NGS
- 2. Aufreingungen für PCR, Hybridisierungen oder Real-Time PCR



# MagCore Size Selection für NGS

# **DNA** Ausbeute

# Product Introduction and Average Recovery

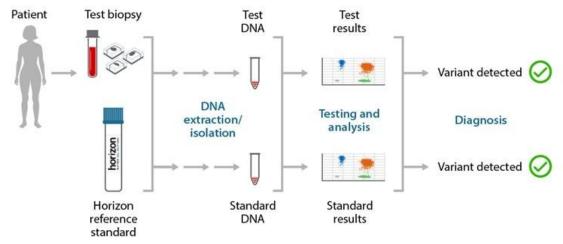
Program	Program Description	Avarage Recovery (%)
701A	DNA Cleanup	>80%
701B	DNA Size Selection 200-500bp	40~60%
701C	DNA Size Selection 100-200bp	>50%

Die Entwicklung, Optimierung und Überwachung von Next-Generation-Sequencing (NGS)-Assays ist eine schwierige Aufgabe Referenzstandards benötigt man um sicherzustellen, dass NGS-Assays auf höchstem Niveau durchgeführt werden

- 1. Optimieren und validieren von bestehende NGS-Workflows
- 2. Analysieren der Sensitivität und Spezifität eines Assays
- 3. Validierung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze



Gute Referenzstandards → Verhalten sich wie echte Patientenproben



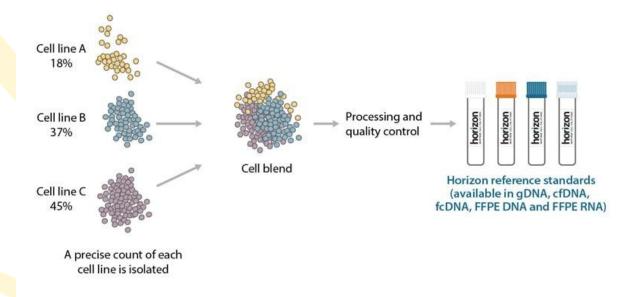
Vor allem können sie auch Tumorgewebe sehr gut simulieren indem die Krebsmutationen in unterschiedlicher Quantität auftreten.

Zellen mit g<mark>ene</mark>tischen Variationen wie Insertionen und Deletionen (INDELs), Fusionen, Einzelnukleotidvarianten (SNVs) und Kopienzahlvarianten (CNVs) werden gemischt, um unsere Referenzstandards herzustellen.



Gute Referenzstandards → Verhalten sich wie echte Patientenproben

Zelllinien werden gemischt, um Varianten mit bestimmten Häufigkeiten zu erzeugen, und dann in verschiedenen Formaten angeboten (siehe Tabelle 1), um diagnostische Proben nachzuahmen und in einer Vielzahl von Assays zu verwenden.



z.B. Oncospan Panel: BRCA2 - p.K1691Nfs\*15 (Deletion) Häufigkeit 32,5%



Oncospan Tumor Panel Reference Standard (HD827)

Tumor Reference Standard

Beinhaltet 370 Variants von 152 Krebsgenen

neu! batch spezifische in silico NGS Daten

Verfügba<mark>r auch in</mark> FFPE or cell-free D<mark>N</mark>A Format

Aus Zellinien hergestellt

Ideal zur Validierung von Assays und als Kontrolle danach





Horizon bietet auch Kundenspezifische Referenz Standards an

Online Formular!

Zur auswahl:

- 1. Format: gDNA, FFPE, cfDNA
- 2. Bis zu 4 Genvarianten
- 3. Allel Häufigkeit
- 4. Konzentration festlegbar

