

Szakmai indoklás Illumina MiSeq újgenerációs szekvenáléhoz

A PTE KK Orvosi Genetikai Intézet az emberi genom veleszületett és szerzett rendellenességeivel, az ezek következtében kialakuló kórállapotok diagnosztikájával, megelőzésével és kezelésével foglalkozó diagnosztikus-, betegellátó-, oktató- és kutatóhely. 2015-ben az Emberi Erőforrások Minisztériuma az Intézetet hivatalosan is Ritka Betegségek Szakértői Központnak jelölte ki.

A projekt során a genomikai szinten meghatározott ritka és diagnosztizálatlan (rare and undiagnosed diseases) betegségek egy kiemelt körének kutatását és a diagnosztikai, terápiás szempontból releváns fejlesztését tervezzük elvégezni. A projekt módszertanát tekintve a legkorszerűbb molekuláris biológiai, bioinformatikai és molekuláris genetikai módszereket alkalmazva valósulnak meg a tervezett célkitűzéseink, melyek hozzájárulhatnak új diagnosztikai és terápiás eljárások fejlesztéséhez.

Az intézmény a projektben elérni kívánt eredményeihez elengedhetetlenül szükséges a hosszú távú céljainkhoz illeszkedő, műszerpark fejlesztése, köztük az Illumina MiSeq újgenerációs szekvenáló (NGS) készülék beszerzése, amely egy költséghatékony asztali szekvenáló berendezés.

Az Illumina cég a magas átírási képességű DNS szekvenáló berendezések vezető gyártója világszerte. Az újgenerációs szekvenálás során keletkező adatok jelentős hányada az általuk gyártott és forgalmazott újgenerációs szekvenáló készülékekből származik. Az Illumina a „Sequencing By Synthesis” technológiáját alkalmazva teszi elérhetővé a szekvenálás használatát számos területen. A „Sequencing By Synthesis” (SBS) technológia felhasználásával hozták létre a világon elérhető összes szekvenciaadat több mint 90%-át. Az Illumina készülékek nagy pontosságúak, nagy mennyiségű szekvencia adatot szolgáltatnak, megfelelően nagy read hosszal és kívánság szerinti lefedettséggel.

Az Illumina MiSeq az egyik leggyakrabban használt platform a kutató, illetve a klinikai vizsgálatokat folytató laboratóriumokban, mely a leggyorsabb és legsokoldalúbb megoldás abban az esetben, ha a kísérletre rendelkezésre álló idő limitált. A szekvenálási folyamat (beleértve a nyers adatok feldolgozását) akár 8 óra is lehet. Jelenleg a MiSeq rendszer rendelkezik a legegyszerűbb szekvenálási módszerrel az újgenerációs szekvenálók közül. Az eredmények kiértékelése napok helyett órákban mérhető. A Nextera típusú könyvtárkészítő

reagens segítségével a szekvenáláshoz használt könyvtárak készítése mindösszesen 90 percet vesznek igénybe. Ezt követően a Miseq készüléken automatizált klonális amplifikáció és szekvenálás alkalmazása 4 óra alatt végrehajtható. A rendszerbe integrált vezérlő számítógép használatával a MiSeq rendszer alkalmas a teljes adatelemzést mindösszesen 3 óra alatt elvégezni.

Felhasználóbarát érintőképernyős kezelőfelületének és az előkészített reagenseknek köszönhetően nagyon egyszerű a készülék használata és kezelése. A készülék a reagensek LOT számának azonosításával rendelkezik. A kompakt MiSeq alkalmas a klaszterek képzésére, paired-end olvasásra és az adatok elemzésére is. Ennek köszönhetően az egyéb kiegészítő berendezések szükségtelenné válnak, így a laboratóriumban minimális helyigény szükséges. A készülék innovatív integrált „mintától az eredményig” munkafolyamata lehetővé teszi DNS és RNS alapú feladatok végrehajtását minimális manuális munka beiktatásával. A szekvenálás mindössze egy gombnyomással elindítható, ezáltal a „mintától az eredményig” munkafolyamat a felhasználó beavatkozása nélkül zajlik, ezáltal kizárja az esetleges hibákat. A MiSeq áteresztőképessége rugalmasan változtatható, így kisebb kihozatalra váltva kisebb áteresztőképességű feladatok ellátására is megfelelő, melynek révén lehetővé válik a Sanger szekvenálás, valamint a qPCR alapú technikák elhagyása. Az egy futásban szekvenálható minták száma tetszőlegesen változtatható 1 és 384 között.

Az Illumina MiSeq berendezés futtatásonként 1–25 millió egyedi szekvenálási leolvasás végrehajtására alkalmas (single read), az egyes leolvasások maximális hossza 300 nukleotid lehet. A készülék képes kétirányú (paired-end) típusú leolvasások kivitelezésére, ilyenkor a leolvasások száma maximum 50 millió, hosszuk pedig 2×300 bázispár lehet. Alkalmazásával lehetőség nyílik kisebb genomok de novo szekvenálására és összeállítására; egyes genomi variációk megbízható detektálására; valamint metagenomikai (16 S RNS alapú- valamint teljes metagenomikai), transzkriptomikai és funkcionális genomikai analízisek végrehajtására.

A MiSeq szekvenáló készülék számos adatértékelési megközelítést támogat. A berendezésbe integrált nagy teljesítményű számítógép végzi a „base calling” és a „quality scoring” folyamatát. A szekvenálás során generált adatok elemzésére számos szabad hozzáférésű alkalmazás áll rendelkezésre. A MiSeq szekvenáló interneten keresztül kapcsolódhat az Illumina felhőalapú szolgáltatásához, a „Basespace”-hez. A „Basespace” környezetben elérhető alkalmazások lehetővé teszik az olyan másodlagos adatértékelési lépések végrehajtását, mint a szekvencia illesztés, variáns azonosítás, annotálás, vizualizálás és adat interpretálás.

Az Illumina MiSeq többek között alkalmas a következő feladatok végrehajtására:

- Nagy sebességű, multiplexált 16 S amplikon szekvenálás
- Kisméretű genomok de novo szekvenálása
- Nagy sebességű, multiplexált 16 S rRNS alapú mikrobiális szekvenálás
- RNS szekvenálás
- Kis RNS szekvenálás
- Célzott újraszekvenálás
- Plazmid szekvenálás
- Kromatin immunprecipitációs szekvenálás
- Nagyszabású szekvenálási könyvtárak minőségellenőrzése


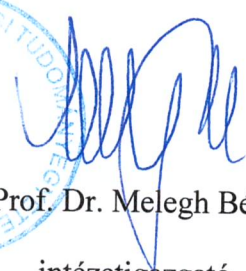
A kereskedelmi forgalomban elérhető hasonló műszerek közül ez az egyetlen készülék, amely képes pontosan meghatározni a homopolimer szakaszokat a DNS molekulán belül a fluoreszcensen jelölt „reversible terminator chemistry” kémiaiájából kifolyólag. A homopolimer szakaszok pontos ismerete kiemelkedően fontos a monogénes betegségek vizsgálata során.

A projektben résztvevő három Egyetem (SZTE, DE és PTE) által közösen bevállalt 450 beteg klinikai exomjának vizsgálata során kapott eredményeinek összehasonlíthatóságához feltétlenül szükséges, hogy a vizsgálatok azonos eszközön, Illumina MiSeq platformon történjenek. Ennek hiányában az egyes Egyetemek által kapott nyersadatok kiértékelése után kapott eredmények egymással nem vethetőek össze teljes egészében. A projektben résztvevő Egyetemek a saját vizsgálataikat ugyanezen az Illumina MiSeq platformon tervezik elvégezni.

Az Illumina MiSeq egy kevésbé költséges gép, a cég által végrehajtott fejlesztéseinek köszönhetően többféle, különböző readhosszt és adatmennyiséget nyújtó kit közül választhatunk a kutatási céloknak megfelelően. A rendszer az Illumina által fejlesztett SBS technológia segítségével a TruSeq szekvenáló kímát használja, amely a gyors illetve alacsony költségvetésű genetikai analízisek széles körű alkalmazása révén ideális platformmá teszi a rendszert. A TruSeq jellegzetessége, hogy a felhasználóknak a legmagasabb adatintegritást nyújtja a legmagasabb hibátlan leolvasás hozamával és a legtöbb bázis-leolvasások számával Q30 minőségi érték felett. A klinikai exom vizsgálatokat mindhárom, a projektben résztvevő

intézmény (SZTE, DE és SZBK) az Illumina TruSight One szekvenáló panellel végzi, mely tökéletesen használható a beszerezni kívánt Illumina MiSeq platformon.

Pécs, 2017.09.29.



Prof. Dr. Melegh Béla
intézetigazgató