

Next Generation Sequencing: Technische Details

Untersuchungsmaterial:

Mit der NGS Methode können sowohl Flüssigkeiten wie Blut oder Knochenmarksaspirat als auch Formalin-fixiertes, paraffineingebettetes Gewebe (FFPE) oder zytologische Ausstriche (auch bereits gefärbte) verwendet werden.

Je nach Beschaffenheit des Untersuchungsmaterials werden die Tumorzellen durch zentrifugieren, stanzen, abkratzen oder Lasermikrodissektion gewonnen. Der Pathologe definiert das zu analysierende Tumorareal oder die Tumorzellpopulation und legt den Tumorzellgehalt fest. Für Stanzen und abgekratztes Material muss der Tumorzellgehalt höher als 20% sein. Wenn dies nicht der Fall sein sollte, werden Tumorzellen spezifisch mittels Lasermikrodissektion selektioniert, um somit einen Tumorzellgehalt von höher als 80% zu erreichen.

DNA/RNA Gewinnung:

Für Proben mit niedrigem Zellgehalt werden die Zellen in Lysepuffer überführt und mit Proteinase K über Nacht inkubiert.

Für Proben mit viel Gewebe wird die DNA mittels dem kommerziellen Kit „Maxwell® 16 FFPE Plus LEV DNA Purification Kit (Promega) gemäss den Instruktionen des Herstellers extrahiert.

Die somit erhaltene DNA Konzentration wird mit dem Qubit dsDNA high sensitivity Kit (Ion Torrent, Life Technologies) gemessen.

Für die RNA Extraktion wird der RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit verwendet (Life Technologies). Danach wird die RNA in cDNA umgeschrieben.

NGS Arbeitsschritte (Ion Torrent System):

1. Erstellung der DNA Library (Amplifikation der Ziel-Fragmente von 10 ng genomischer DNA / cDNA, partieller Verdau der Primer Sequenz mit FuPa-Reagenzien, Barcode und Adapter-Ligation, Aufreinigung und DNA-Konzentrationsmessung mittels qPCR);
2. Klonale Amplifikation (Emulsions-PCR und Aufreinigung der positiven Ion Sphere Particles (ISPs) mittels dem Ion Chef Gerät);
3. Chip wird auf den Sequenzer (PGM/SV5) geladen.

Auswertung der NGS Daten:

Die so entstandenen Rohdaten werden zuerst mit dem Torrent Server (ISP Density, ISP summary, Read length, Aligned to Homo-sapiens, Accuracy, Alignment Quality) visuell kontrolliert. Alle Proben werden zusätzlich mit dem Plugin „coverageAnalysis“, analysiert. Damit wird verifiziert, ob alle Bereiche des Panels genügend abgedeckt sind (coverage). Als Referenzgenom dient das human genome 19 (hg19). Danach werden die Bam Files auf unseren lokalen Server mit der installierten Software Ion Reporter geladen und ausgewertet. Varianten werden nach folgenden Kriterien gefiltert: „Variant Type, PValue, Minor Allele Frequency und Variant Effect“. Der integrative Genomic Viewer (IGV) wird zusätzlich verwendet um zwischen echten Mutationen und Softwareinterpretationsfehlern unterscheiden zu können.