

Next Generation Sequencing (NGS)

Iris van Dal, Max van Kraaij en Eric van Vught

26-10-2021

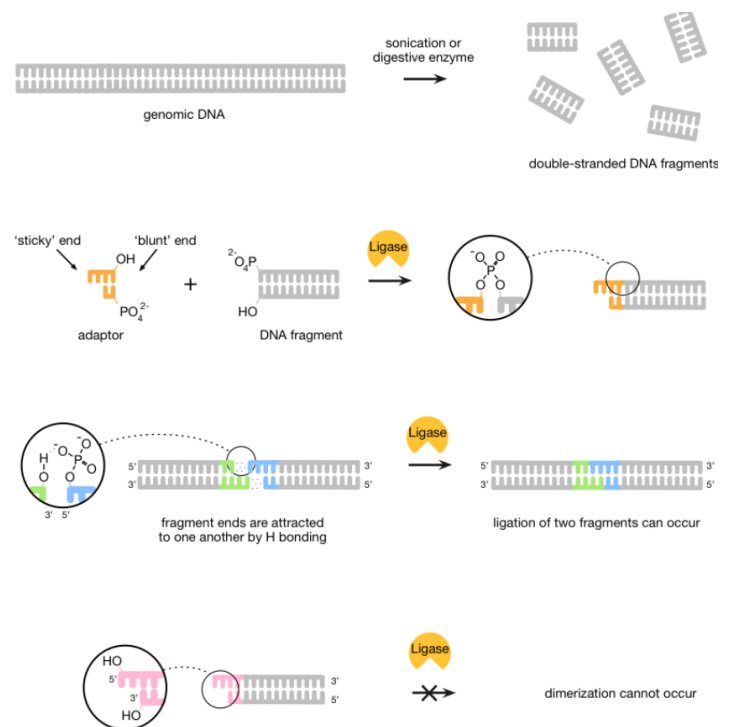
Bij veel DNA-onderzoek wordt gebruik gemaakt van sequenzen. Door deze nieuwe techniek verloopt DNA-onderzoek steeds sneller. Daarnaast wordt DNA-onderzoek middels NGS ook een stuk goedkoper. Deze nieuwe en snelle technieken noemen we 'Next Generation Sequencing' (NGS). Hiermee kunnen grote stukken DNA in een korte tijd onderzocht worden.

Naast het klassieke Sanger sequencing, is een andere manier om de primaire structuur van een biomolecuul te bepalen middels Next Generation Sequencing (NGS). Dit is de verzamelnaam voor nieuwe en snellere technieken, waarbij alle gewenste genen in één keer onderzocht worden op de aanwezigheid van ziekte veroorzakende mutaties [1]. Ook worden er grotere stukken DNA gesequenced waardoor er bijvoorbeeld hele genomen gesequenced worden.

Er zijn verschillende technieken van NGS. Deze lopen allemaal de volgende stappen door: library preparation, amplificatie en sequentiebepaling. Library preparations worden gemaakt middels willekeurige fragmentatie van DNA, gevolgd door ligatie met aangepaste linkers. De geligeerde fragmenten worden vervolgens geamplificeerd door klonale amplificatiemethodes en PCR. Hierna wordt het DNA gesequenced en hier zijn verschillende opties voor [2].

Library preparation begint bij het fragmenteren van DNA, zodat er kleine strengen gecreëerd worden. Dit kan enzymatisch of door excitatie middels echografie. Aan deze fragmenten worden adapters geligeerd middels DNA-ligase. Adapters zijn korte, dubbelstrengs synthetische DNA stukjes en zorgen voor een complementaire tegenhanger. Deze zijn zo gesynthetiseerd dat het ene uiteinde 'kleverig'

is en het andere uiteinde juist niet. De bedoeling hiervan is om het niet-kleverige uiteinde te verbinden met het niet-kleverige uiteinde van het DNA. Echter kan dit leiden tot vorming van dimeren. Dit is niet gewenst en wordt dan ook voorkomen door gebruik te maken van de chemische structuur van DNA. Dit wordt als volgt gedaan: ligatie vindt plaats tussen de 3'-OH- en 5'-P-uiteinden. Door de fosfaat van het kleverige uiteinde van de



FIGUUR 1 WEERGAVE VAN DE LIBRARY PREPARATION STAP UITGEBEELD IN 4 STAPPEN.

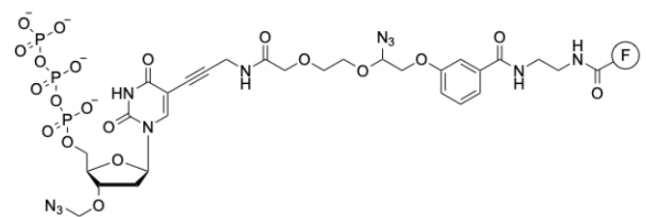
adapter te verwijderen en daarom in plaats daarvan een 5'-OH-uiteinde te creëren, kan DNA-ligase geen binding maken tussen de twee uiteinden [2]. Deze stappen zijn ook weergegeven in figuur 1.

Om de sequentie te kunnen bepalen, moeten de fragmenten geclusterd worden in PCR-kolonies, ofwel 'polonies'. Dit zijn veel kopieën van een bepaald fragment. Deze polonies zijn op een vlakke manier bevestigd en de kenmerken kunnen worden gemanipuleerd. De volgende stap is amplificatie. Dit is nodig zodat het signaal van de sequencer sterk genoeg is om nauwkeurig gedetecteerd te worden. Er zijn verschillende soorten amplificatieprocessen waarbij PCR wordt gebruikt om grote aantallen DNA-clusters te creëren, zoals emulsion PCR en Bridge PCR.

Na de amplificatie stap volgt de sequencing stap. Hiervoor zijn verschillende methoden van NGS ontwikkeld. Dit zijn Pyrosequencing, Ion torrent semiconductor sequencing, sequencing by ligation (SOLiD), Reversible terminator sequencing (Illumina), 3'-O- blocked reversible terminators en 3'- unblocked reversible terminator. Hoe sequencing verder in zijn werk gaat en hoe daadwerkelijk de sequentie wordt bepaald, hangt af van de verschillende methodes.

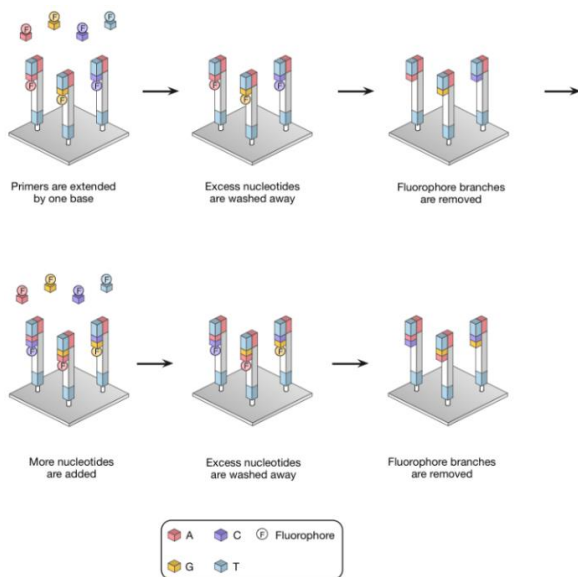
Illumina

Waar bij de Sanger-methode gebruik gemaakt wordt van dideoxynucleotides om de amplificatie te beëindigen, wordt dit bij Reversible terminator sequencing gedaan met gemodificeerde nucleotiden. Ook wordt er bij deze techniek geen Emulsie PCR gedaan, maar een Bridge-PCR. Reversible terminator kan onderverdeeld worden in twee categorieën: 3'-O-blocked reversible terminator en 3'-unblocked reversible terminators. Bij een 3'-O-blocked reversible terminator wordt er gesequenced middels synthese, waarbij de primers stapsgewijs worden verlengd. De sequencing-primers en -sjablonen worden op een drager bevestigd. De drager wordt blootgesteld aan de DNA basen, waaraan naast een 3'-O- azidomethylgroep een andere fluorofoor is bevestigd (aan de stikstofbase). De structuur hiervan is weergegeven in figuur 2.



FIGUUR 2 WEERGAVE VAN DE STRUCTUUR VAN DE FLUOROFOOR GROEP DIE BIND AAN DE STIKSTOFBASEN.

Alleen de juiste base hecht aan het target DNA en wordt aan de primer geligeerd. De vaste drager wordt in beeld gebracht en de nucleotiden die niet zijn gehecht worden weggewassen. De fluorescerende tak van de gebonden nucleotiden wordt gesplitst met TCEP. Dit verwijdert ook de 3'-O-azidomethylgroep en regenereert weer een 3'OH-groep. De cyclus kan hierna worden herhaald. Bij de laatste cyclus wordt de fluorescerende tak niet gesplitst zodat er een signaal gedetecteerd kan worden. Dit proces wordt weergegeven in Figuur 3.



FIGUUR 3 WEERGAVE VAN DE LAATSTE CYCLUS. IN DEZE CYCLUS WORDEN DE FLUOROFOOR GROEPEN VERWIJDERD.

De reversible termination group met een 3'unblocked reversible terminator zit aan de base en fluorescentiegroep vast, die nu deel uitmaakt van de terminatiegroep en een reporter. Deze methode verschilt op drie manieren van de 3'-O-blocked reversibel terminator: de 3'positie is bij deze methode niet geblokkeerd, wat een vrije 3'OH groep creëert. Tevens is de fluorofoor hetzelfde voor alle vier de basen en de gewijzigde base

Alle auteurs hebben de laatste versie gecontroleerd en hebben toegestemd dat dit artikel op deze manier gepubliceerd wordt.

- [1] "Next Generation Sequencing - NGS - UMC Utrecht." [Online]. Available: <https://www.umcutrecht.nl/nl/next-generation-sequencing-ngs>. [Accessed: 13-Oct-2021].
- [2] "Next generation sequencing." [Online]. Available: <https://www.atdbio.com/content/58/Next-generation-sequencing#454-Pyrosequencing>. [Accessed: 13-Oct-2021].

stroomt achter elkaar in plaats van tegelijkertijd.

BioVendor Group

BioVendor Group heeft een nieuwe technologie fastGEN ontwikkeld voor onderzoek naar de mutatiestatus van oncomarkers in monsters. FastGEN is gebaseerd op een ultradiepe sequencing van korte amplicons verkregen door een PCR-reactie met speciale gelabelde hydride primers.

De fastGEN-technologie is eenvoudig, ultra gevoelig, specifiek en effectief. Het is perfect aangepast aan de diagnostiek en biedt nieuwe voordelen voor klinisch materiaal.

Schema of genotypering procedure:

1. Monsters en Master Mixes met verschillende indices zijn gemixed (10 min)
2. De reactie worden gerund in een real-time PCR
3. DNA wordt gesequenced op Illumina sequencers