

PRIMERJAVA METOD ZA OPREDELITEV KAKOVOSTI IN KONCENTRACIJE KNJIŽNIC NGS

Bojan Papić*, Urška Kuhar, Darja Kušar

Inštitut za mikrobiologijo in parazitologijo, Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, Slovenija

bojan.papic@vf.uni-lj.si

Sekvenciranje naslednje generacije (NGS) postaja sestavni del raziskav na praktično vseh področjih bioloških in biomedicinskih ved. Nadzor kakovosti knjižnic med pripravo knjižnic je ključen za pridobitev visoko kakovostnih in nepristranskih rezultatov (zaporedij). V raziskavi smo želeli dobiti vpogled v primerljivost različnih metod za fragmentacijo genomske DNA (gDNA) ter opredelitev koncentracije in kakovosti knjižnic NGS. S tem namenom smo gDNA fragmentirali encimsko (Ion Xpress Plus Fragment Library Kit) in mehansko (M220 Focused-ultrasonicator). Iz encimsko fragmentirane gDNA, ki smo jo izolirali iz 12 izolatov *Listeria monocytogenes*, smo izdelali knjižnice NGS. Koncentracijo knjižnic smo opredelili s tremi pogosto uporabljenimi metodami za določanje koncentracije DNA: (i) kapilarno elektroforezo (QIAxcel in LabChip GX; tudi za opredelitev kakovosti knjižnic), (ii) kvantitativnim PCR (GeneRead Library Quant Kit) in (iii) fluorimetrično (Qubit 3.0). Preverili smo tudi uspešnost izbora ~480 bp velikih fragmentov DNA s kroglicami Agencourt AMPure XP. Obe metodi fragmentacije DNA sta bili uspešni. Izmerjene koncentracije knjižnic so se med seboj razlikovale do 4,6-krat, kar kaže na znatne razlike med različnimi kvantitativnimi metodami. Izbor fragmentov DNA želene velikosti s kroglicami je bil uspešen. Za uspešno sekvenciranje je potrebna kombinacija kapilarne elektroforeze za nadzor kakovosti knjižnic in ene od ostalih kvantitativnih metod za opredelitev njihove koncentracije.

Ključne besede: sekvenciranje naslednje generacije (NGS); nadzor kakovosti; kvantifikacija DNA

Uvod

Sekvenatorji naslednje generacije (NGS) omogočajo hkratno določanje nukleotidnega zaporedja več sto tisoč kratkih fragmentov DNA. Zaradi širokega nabora aplikacij na praktično vseh področjih bioloških in biomedicinskih ved postajajo sestavni del številnih laboratorijev za molekularno biologijo. Tehnologije NGS druge generacije, kot sta platformi Illumina in Ion Torrent, zahtevajo pripravo knjižnic NGS. Priprava knjižnic vključuje encimsko ali mehansko fragmentacijo DNA na fragmente želene velikosti ter vezavo adapterjev na oba konca fragmentov. Po potrebi lahko knjižnice NGS tudi označimo s črtnimi kodami DNA (ang. *barcoding*), kar omogoča hkratno sekvenciranje več knjižnic, in pomnožimo v verižni reakciji s polimerazo (PCR). Tako pripravljene knjižnice NGS nato sekvenciramo. Za izdelavo nepristranskih in knjižnic NGS visoke kakovosti je ključnega pomena, da spremljamo njihovo kakovost že med posameznimi koraki priprave. Ključna koraka pri nadzoru kakovosti sta opredelitev kakovosti fragmentov DNA in natančno določanje koncentracije knjižnic NGS. Zaradi neprimerne nadzora kakovosti knjižnic so lahko rezultati sekvenciranja z NGS pristranski in neoptimalni. V primeru hkratnega sekvenciranja več knjižnic je še posebej problematična njihova neenakomerna zastopanost (1).

Material in metode

Genomsko DNA (gDNA) dvanajstih izolatov *Listeria monocytogenes* smo izolirali s komercialnim kompletom DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Nemčija). Koncentracijo gDNA smo določili fluorimetrično z aparaturo Qubit 3.0 (Qiagen). Za encimsko fragmentacijo gDNA smo uporabili komplet Ion Xpress Plus Fragment Library (Thermo Fisher Scientific, ZDA), s katerim smo 100 ng gDNA fragmentirali 7 minut v 40- μ l reakcijskih mešanicah. Mehansko fragmentacijo gDNA (100 ng gDNA v 50 μ l vzorca) smo izvedli s ultrasonikatorjem M220 Focused (Covaris, ZDA). Ciljna velikost fragmentov gDNA pri obeh metodah je bila ~480 bp, kar je optimalna dolžina fragmentov za sekvenciranje 400 bp velikih fragmentov DNA s kompletom Ion PGM Hi-Q Sequencing Kit (tehnologija Ion Torrent). Knjižnice NGS smo pripravili in označili s kompletom Ion Xpress Plus gDNA Fragment Library (Thermo Fisher Scientific), pri čemer smo uporabili encimsko fragmentirano gDNA. Izbor fragmentov DNA velikosti ~480 bp smo izvedli s kroglicami Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, ZDA) po protokolu, opisanem v Bronner in sod. (2). Koncentracijo in kakovost DNA smo opredelili s kapilarnima elektroforezama QIAxcel (Qiagen) in LabChip GX (PerkinElmer, ZDA), fluorimetrom Qubit 3.0 (Thermo Fisher Scientific) in s kvantitativnim PCR –GeneRead Library Quant Kit (Qiagen).

Rezultati

Fragmentacija DNA. Tako encimska kot mehanska metoda sta bili uspešni pri fragmentaciji gDNA na fragmente velikosti ~480 bp. Rezultati kapilarne elektroforeze so pokazali, da je bila večina fragmentov po encimski metodi dolga 300–700 bp, večina fragmentov po mehanski metodi pa 100–800 bp. V nobenem vzorcu nismo detektirali ostankov nezadostno fragmentirane gDNA.

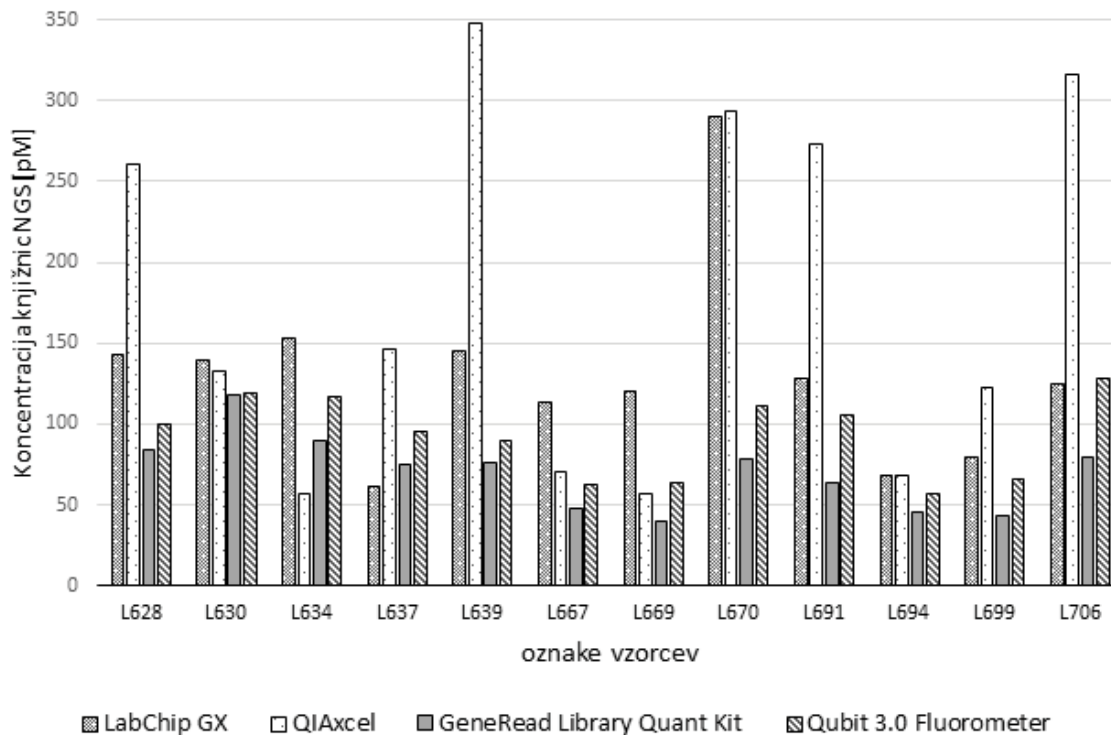
Opredelitev koncentracije knjižnic NGS. Rezultati kvantifikacije knjižnic NGS s štirimi različnimi metodami so prikazani na Sliki 1. Koncentracije so se med različnimi metodami razlikovale do 4,6-krat. Pri vseh 12 knjižnicah smo najvišjo koncentracijo DNA izmerili s kapilarno elektroforezo (LabChip GX in/ali QIAxcel). Rezultati kažejo, da kapilarna elektroforeza lahko preceni koncentracijo knjižnic. Pri 11 od 12 knjižnic smo najnižjo koncentracijo izmerili s kvantitativnim PCR (GeneRead Library Quant Kit). Rezultati meritev z aparaturo Qubit in kvantitativnim PCR so bili primerljivi (do 1,6-kratna razlika v koncentraciji).

Izbor ~480 bp velikih fragmentov DNA. Z magnetnimi kroglicami Agencourt AMPure XP smo uspešno ločili ~480 bp velike fragmente gDNA od preostalih (krajših) fragmentov DNA (Slika 2).

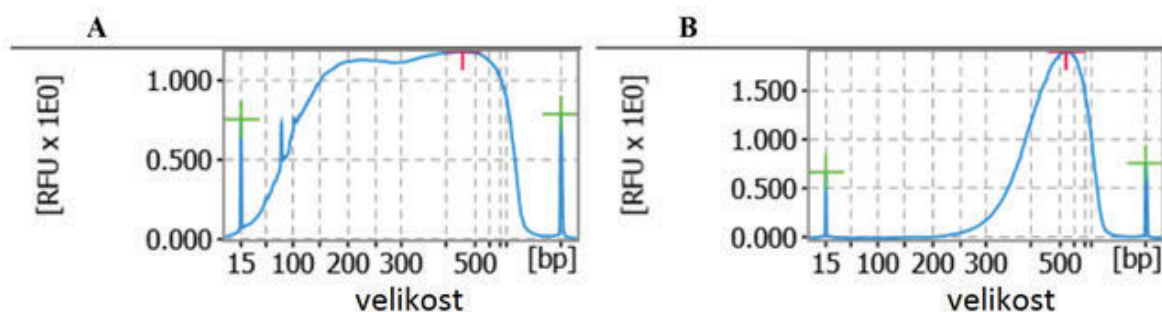
Razprava

Obe metodi fragmentacije gDNA sta bili uspešni, zato sklepamo, da je bolj kot izbor metode fragmentacije pomembna kakovost vstopne gDNA (gDNA z visoko molekularno maso in brez ostankov RNA). Z mehansko fragmentacijo smo dobili fragmente gDNA z nekoliko večjim naborom velikosti, kar pa zaradi kasnejšega izbora fragmentov želene velikosti ni omejujoč dejavnik. Pokazali smo, da s kroglicami Agencourt AMPure XP uspešno ločimo fragmente DNA velikosti ~480 bp od preostalih fragmentov gDNA. Postopek lahko torej predstavlja cenejšo alternativo drugim metodam, ki jih proizvajalci sicer običajno priporočajo za izbor fragmentov DNA želene velikosti (npr. E-Gel SizeSelect, Pippin Prep).

Koncentracije knjižnic, izmerjene z različnimi metodami, so se medsebojno razlikovale do 4,6-krat. Znatna odstopanja med različnimi metodami najdemo tudi v literaturi, in sicer so Hussing in sod. (3) ob primerjavi sedmih različnih metod za določanje koncentracije knjižnic ugotovili do 100-kratno razliko v koncentraciji, razlike pa so bile odvisne tudi od koncentracijskega območja DNA. Najvišjo koncentracijo DNA vseh dvanajstih knjižnic smo izmerili s kapilarno elektroforezo, medtem ko smo pri 11 od 12 knjižnic najnižjo koncentracijo izmerili s kvantitativnim PCR. Iz tega sklepamo, da lahko kvantitativni PCR podceni koncentracijo knjižnic NGS, na kar kažejo tudi izsledki drugih raziskovalcev (4). Druga možna razlaga je, da kapilarna elektroforeza pogosto preceni koncentracijo



Slika 2: Mehansko fragmentirana gDNA, izolirana iz vzorca z oznako L630, ločena s kapilarno elektroforezo QIAxcel. A) Fragmentirana gDNA pred izborom ~480 bp dolgih fragmentov. B) Fragmentirana gDNA po izboru fragmentov velikosti ~480 bp s kroglicami Agencourt AMPure XP



Slika 1: Koncentracija knjižnic NGS, ki smo jo opredelili s štirimi različnimi metodami

DNA. Sklepamo lahko, da je za uspešno sekvenciranje potrebna kombinacija kapilarne elektroforeze za nadzor kakovosti knjižnic in ene od kvantitativnih metod za določanje njihove koncentracije. Natančna opredelitev koncentracije knjižnic pred nanosom na platformo (čip oz. pretočno celico) za sekvenciranje je ključna za uspešno sekvenciranje. Izpostaviti velja tudi pomanjkljivost kvantitativnega PCR in fluorimetra Qubit, ki za izračun molarne koncentracije DNA potrebujeta vnaprej določeno povprečno velikost fragmentov v knjižnici in sta od nje močno odvisna. Glede na veliko odstopanje med meritvami, ki so predstavljene v tej raziskavi, se kaže potreba po (i) optimiziranih in enotnih protokolih za kontrolo kakovosti, (ii) identifikaciji vzrokov za podcenjevanje oz. precenjevanje koncentracije DNA pri določenih kvantitativnih metodah in (iii) razvoju novih, visoko občutljivih metod za opredelitev koncentracije in kakovosti DNA. Z visoko občutljivimi in natančnimi metodami za opredelitev koncentracije knjižnic bi lahko izboljšali potek sekvenciranja in dobljene rezultate. Poleg tega bi boljša kvantifikacija lahko omogočala, da v postopek NGS ne bi bilo potrebno vključevati koraka pomnoževanja knjižnic s PCR, ki je sicer v določenih primerih potreben, a vnaša pristranskost. Primer novejšje in visoko občutljive metode za kvantifikacijo knjižnic, ki hkrati omogoča tudi oceno njihove kakovosti, je kapljični digitalni PCR (ddPCR) (1).

Reference

1. Robin JD, Ludlow AT, LaRanger R, Wright WE, Shay JW. Comparison of DNA quantification methods for next generation sequencing. *Sci Rep* 2016; 6: 24067, 10 str. (doi:10.1038/srep24067)
2. Bronner IF, Quail MA, Turner DJ, Swerdlow H. Improved protocols for Illumina sequencing. *Curr Protoc Hum Genet* 2009; July: 0 18, 46 str. (doi:10.1002/0471142905.hg1802s62)
3. Hussing C, Kampmann ML, Mogensen HS, Børsting C, Morling N. Comparison of techniques for quantification of next-generation sequencing libraries. *Forensic Sci Int* 2015: Genetics Supplement Series 5: e276–e278.
4. Heydt C, Fassunke J, Künstlinger H, Ihle MA, König K, Heukamp LC, Schildhaus HU, Odenthal M, Büttner R, Merkelbach-Bruse S. Comparison of pre-analytical FFPE sample preparation methods and their impact on massively parallel sequencing in routine diagnostics. *PLOS One* 2014; 9(8): e104566.

Comparison of methods for NGS library quality control and quantification

Next-generation sequencing (NGS) is rapidly becoming an integral part of biological and biomedical sciences. Quality control during NGS library preparation is essential for obtaining high quality and unbiased sequencing results. In this study, different methods for genomic DNA (gDNA) shearing as well as NGS library concentration and quality assessment were compared. From 12 *Listeria monocytogenes* isolates, gDNA was extracted and enzymatically (Ion Xpress Plus Fragment Library Kit) or mechanically (M220 Focused-ultrasonicator) fragmented. Enzymatically sheared gDNA was used to construct NGS libraries. Three commonly used methods for library quantification were used: (i) capillary electrophoresis (QIAxcel and LabChip GX; also for library quality assessment), (ii) quantitative PCR (GeneRead Library Quant Kit) and (iii) fluorimetry (Qubit 3.0). Also, the performance of

DNA fragment size selection using Agencourt AMPure XP beads was assessed. Both DNA fragmentation methods proved successful. NGS library concentrations varied up to 4.6-fold, indicating marked variability of quantitative methods. Size selection of ~480 bp DNA fragments using Agencourt AMPure XP beads proved successful. In conclusion, a successful sequencing reaction requires a combination of capillary electrophoresis for library quality assessment and one of the remaining quantification methods for library concentration assessment.

Key words: next generation sequencing (NGS); quality control; DNA quantification