

## Automatisierte Probenvorbereitung für das Next Generation Sequencing

# Schneller zum Genprofil

**Die Hochdurchsatzsequenzierung von Genen gewinnt zunehmend Bedeutung für die klinische Molekulardiagnostik. Dabei ist die Präanalytik der eigentliche Engpass im Laborablauf. Die vollautomatische Probenvorbereitung spart viel Zeit und verbessert die Qualität.**

Das *Next Generation Sequencing* (NGS) dient derzeit noch vorwiegend der Forschung, aber das Interesse der klinischen Molekulardiagnostik an dieser Hochdurchsatz-Technik ist enorm. Viele chronische Krankheiten haben multifaktorielle, teilweise genetische Ursachen, die nur durch Analyse einer großen Zahl von Genen aufgeklärt werden können. An unserer Klinik nützen wir NGS, um die molekularen Hintergründe von schweren onkologischen und immunologischen Erkrankungen besser zu verstehen und daraus neue Diagnose- und Therapieverfahren abzuleiten.


Betrachtet man beispielsweise die Genfamilie der Proteinkinasen, die hier eine bedeutende Rolle spielen, so gilt es, etwa

18.000 Exone zu resequenzieren. Sicher könnte man diese Herkulesaufgabe auch mit konventioneller PCR und Sequenzierung bei extremem Automationsaufwand angehen, doch wäre ein gewaltiges Investment allein an Oligonucleotiden erforderlich, das sich erst bei einem Projekt mit mehreren 100 Proben rechnet. Dagegen amortisiert sich die Anschaffung eines NGS-Systems wie Roche GS FLX oder Illumina GA IIX trotz der hohen Anschaffungskosten auch bei zweistelligen Probenzahlen.

Neben dem Preis sind Zeitbedarf und Praktikabilität die Hauptkriterien für den Einsatz eines neuen Verfahrens in der Routinediagnostik. Der eigentliche Engpass beim NGS liegt in der Präanalytik. Zunächst muss die genomische DNA aus

der Probe extrahiert, zerkleinert und mit Sequenzieradaptoren versehen werden. Diese werden anschließend noch angereichert oder direkt sequenziert.

Die Anreicherung der interessierenden Bereiche für diese Bibliothek erfolgt mittels Hybridisierung (*Target Enrichment*) oder PCR-Amplifikation. In unserem Labor benutzen wir meist die erste Technik, um in wenigen Proben eine Vielzahl von Exons bis hin zum kompletten Exom zu sequenzieren. Die Amplicon-Sequenzierung eignet sich dagegen für Ansätze mit hohem Probendurchsatz bei geringer Zahl zu untersuchender Gene.

Mit der SPRI (*Solid Phase Reversible Immobilization*) Technik von Beckman Coulter nutzen wir eine vollautomatisierte Gerätelösung, die innerhalb von 3,5 Stunden sehr reproduzierbar bis zu zehn Bibliotheken für Next-Generation Sequencer erstellt. Bei manueller Präparation benötigten wir dafür einen vollen Arbeitstag. Ein zusätzlicher Vorteil ist, dass das Verfahren stets gleich große Fragmente liefert, die sich mit bioinformatischen Methoden leichter auswerten lassen. 

### Für alle Durchsatzbereiche

Das SPRIworks Fragment Library System von Beckman Coulter dient der vollautomatischen Erstellung von Fragment- bzw. Genbibliotheken mit Hilfe von paramagnetischen Beads. Dieses bislang einzigartige System eignet sich sowohl für den von Dr. Michael Gombert beschriebenen Einsatzbereich der Exomanalyse, als auch für hohe Probenzahlen mit ausgewählten Exons. Das System erstellt in weniger als 5 Stunden vollautomatisch bis zu 10 DNA-Bibliotheken



bei einer Vorbereitungszeit von 10 Minuten.

Das abgebildete SPRIworks-System (plus Methodenkarte) arbeitet mit nur einer Kartusche pro DNA-Bibliothek. Sie automatisiert den gesamten Prozess von der fragmentierten DNA bis zur fertigen Probe für

die PCR und beinhaltet alle enzymatischen Reaktionen und Aufreinigungen sowie die Größenselektion.



Dr. Michael Gombert

Klinik für Kinder-Onkologie, -Hämatologie und  
Klinische Immunologie  
Universitätsklinikum Düsseldorf

#### Kontaktinformation

Beckman Coulter GmbH, Krefeld • Dr. Jan Fiedler • 02151/333-625 • info@beckmancoulter.de