

# Vergleich verschiedener Qualitätskontrollen für DNA PCR-free Libraries vor der Sequenzierung auf dem NovaSeq™6000

Samia Rahel Imadjane, BMA 18-21 Klasse B

Bildungsgang Biomedizinische Analytik HF

Next Generation Sequencing Platform, Vetsuisse, Universität Bern

## 1. Zusammenfassung

Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt auf der Erweiterung der Qualitätskontrolle 2 (QC2) von DNA PCR-free Libraries vor der Sequenzierung auf dem NovaSeq™6000. Die Standard-Qualitätskontrolle (STD-QC2) wird mit zwei weiteren QC-Methoden verglichen.

Die Schwierigkeit besteht darin, dass die STD-QC2 nicht erkennen kann, ob die Adapter während der Library Präparation (Library Prep) beidseitig, einseitig oder gar nicht gebunden haben. Die beidseitigen Adapter sind für die Sequenzierung zwingend erforderlich, sie sind der Schlüssel zur Bindung zwischen den DNA-Fragmenten und den Oligonukleotiden auf der Oberfläche der Flowcell.

Daher befasst sich die vorliegende Arbeit mit der Frage nach der genauen Quantifizierung der adapterligierten Libraries. Neben der Genauigkeit der verschiedenen QC2-Messmethoden, werden die Komplexität der Anwendung, der Zeitbedarf und die Kosten berücksichtigt, verglichen und ausgewertet.

Die Auswertung zeigt, dass das iSeq™100-System die höchste Präzision für die Quantifizierung von adapterligierten Libraries bietet. Darüber hinaus ist es viel einfacher, schneller und kostengünstiger in der Anwendung als die qPCR-Analyse.

## 2. Einleitung

Die Illumina-Sequenzierung durch Synthese (SBS)-Chemie ist die am weitesten verbreitete Next Generation Sequencing (NGS)-Technologie. Mit ihr werden ungefähr 90 % der weltweiten Sequenzierungsdaten generiert [1].

Bei der STD-QC2 wird die Konzentration (ng/μl) und die Fragmentlänge (bp) der fertigen DNA PCR-free Library ermittelt. Im Anschluss kann über diese Angaben die Molarität jeder Library berechnet werden [2]. Um qualitativ hochwertige Daten zu erhalten, benötigt es eine optimale Clusterdichte auf der Flowcell [1]. Wird ein Lauf über- oder unterladen, hat das einen grossen Einfluss auf die Qualität des Laufs [3]. Die QC2 dient dem optimalen Poolen, zielgenauen Mischen und Laden der Proben für die Sequenzierung auf dem NovaSeq™6000 [4].

## Nutzen und Motivation der Themenwahl

- Bessere Ausbeute & Verbesserung der Sequenzierungskapazität
- Erreichung der gewünschten Genom Abdeckung
- Vereinfachung des Arbeitsablaufs
- Zeit und Kosten sparen

## 3. Ziele und Fragestellungen

Der Vergleich der STD-QC2 von DNA PCR-free Libraries mit zwei weiteren QC-Methoden und Herausfilterung der QC-Methoden welche sich unter Berücksichtigung der Kosten, Zeit und Anwendung einfach im Laboralltag durchführen lassen.

Fragestellung 1: Welche zusätzlichen Qualitätskontrollen eignen sich neben der QC2, am besten zur optimalen Vorbereitung der Sequenzierung?

Fragestellung 2: Welche Qualitätskontrollen sind im Laboralltag in Bezug auf Kosten, Zeit und Anwendung am besten umsetzbar?

## 4. Material und Methodik

Bei den Proben handelt es sich um **extrahierte und isolierte gDNA**. Das Hauptaugenmerk lag auf der gleichen Library Prep der DNA, die alle vor der Sequenzierung auf dem NovaSeq™6000 mit der **DNA PCR-Free Library Prep** erarbeitet worden sind.

Die beiden neuen Methoden sind das **iSeq™100-System** und die **quantitative PCR (qPCR)**. Das iSeq™100-System kopiert den NovaSeq™6000 in kleinem Umfang, beide arbeiten nach dem gleichen Prinzip. Bei der qPCR werden mit SYBR-Green nur vollständige Libraries nachgewiesen. Zur Überprüfung wurden vier Projekte herangezogen, bei denen die STD-QC2 mit den neuen Messmethoden verglichen, abgewogen und ausgewertet wurde

## 5. Ergebnisse

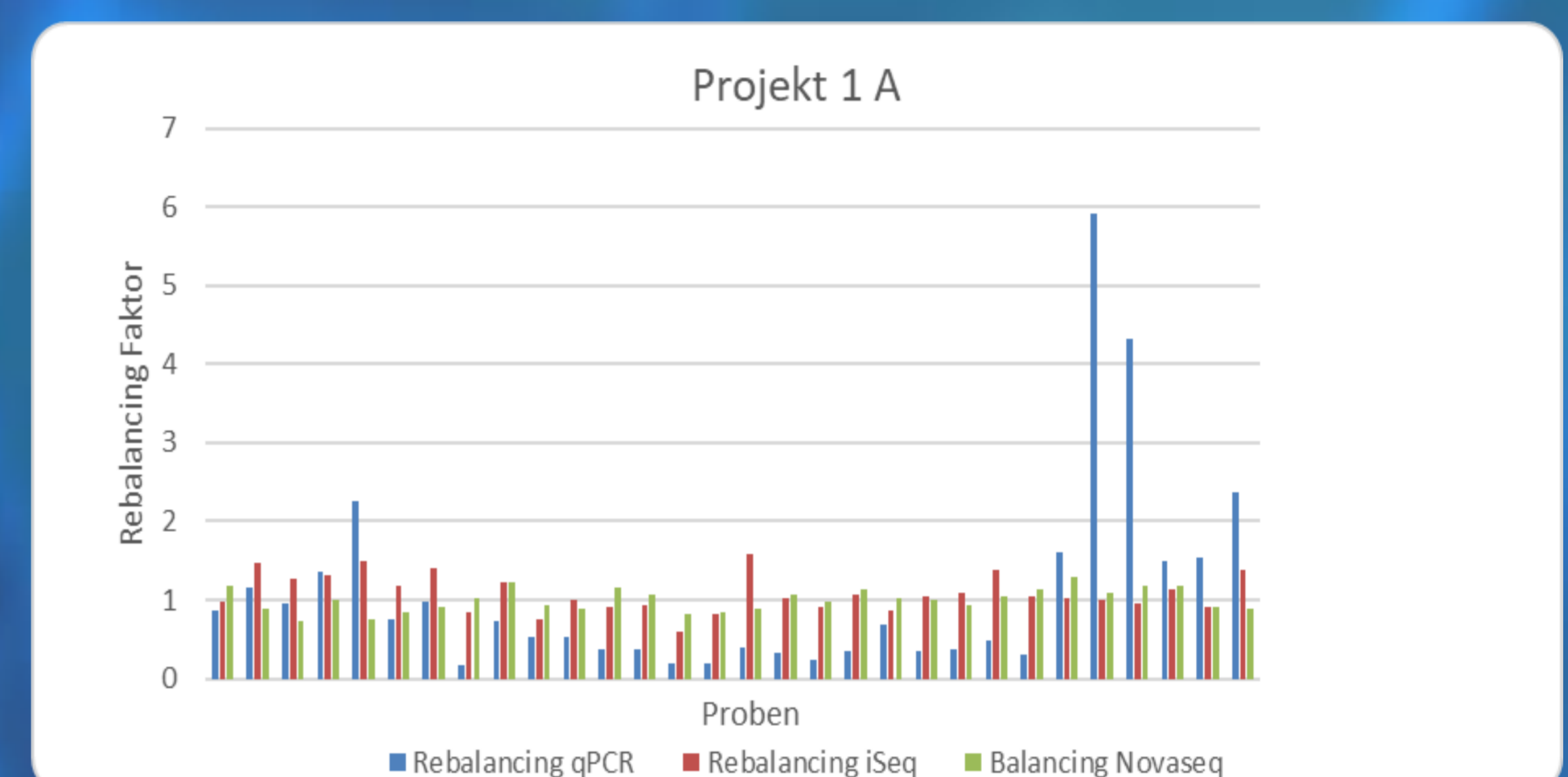


Abb.1 Ergebnisse Projekt 1A (Proben 1-30) (Imadjane, 2021)

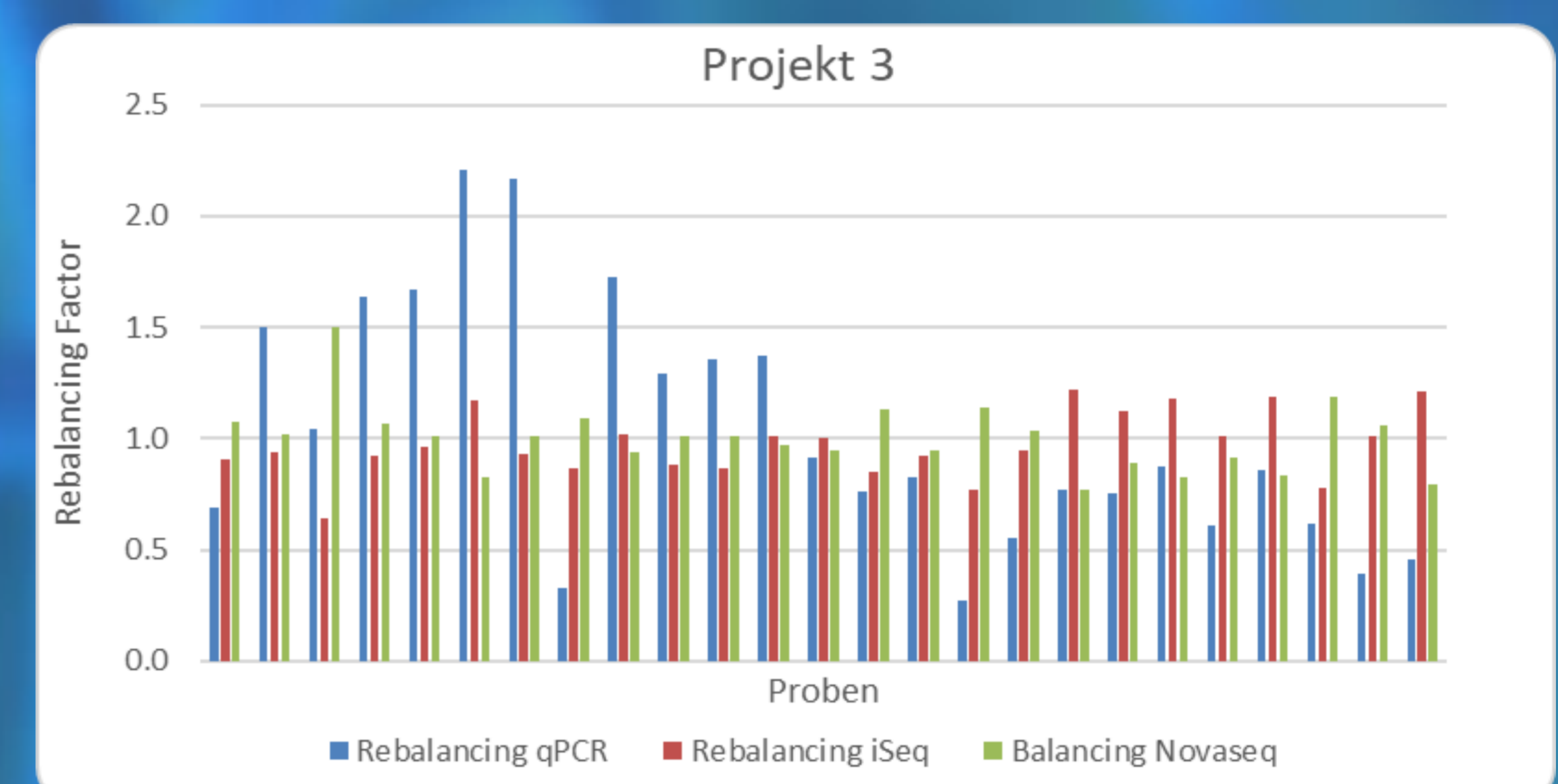


Abb.2 Ergebnisse Projekt 3 (Proben 1-25) (Imadjane, 2021)

## 6. Diskussion

Der qPCR-Faktor zeigt sich sehr variabel und hat keine Konstanz. Entweder ist der Faktor sehr hoch oder sehr tief. Das führt zu einem Über- oder Unterladen bei einem Lauf.

Die Anwendung ist sehr zeitintensiv, benötigt eine Vielzahl an Pipettierungsschritten und Verbrauch vieler verschiedener Reagenzien. Dies führt zu einem erhöhten Risiko für Kontaminationen.

Das iSeq™100-System liefert die höchste Messpräzision von allen in dieser Arbeit verwendeten Messmethoden. Die Werte zeigen sich sehr ausgeglichen. Die Anwendung ist sehr einfach, die Bedienung des Gerätes benutzerfreundlich und kostentechnisch günstiger als die qPCR-Analyse.

### Referenzen

- [1] Illumina. (2017). illumina.com. Abgerufen am 13. April 2021 von Illumina, Inc: [https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/illumina\\_sequencing\\_introduction.pdf](https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/illumina_sequencing_introduction.pdf)
- [2] Illumina. (2017). illumina.com. Von [https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry\\_documentation/samplepreps\\_truseq/truseq-dna-pcr-free-workflow/truseq-dna-pcr-free-workflow-reference-1000000039279-00.pdf](https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/samplepreps_truseq/truseq-dna-pcr-free-workflow/truseq-dna-pcr-free-workflow-reference-1000000039279-00.pdf) abgerufen
- [3] Illumina. (14. April 2021). illumina.com. Von [https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/system\\_documentation/cluster-optimization-overview-guide-1000000071511-00.pdf](https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/system_documentation/cluster-optimization-overview-guide-1000000071511-00.pdf) abgerufen
- [4] Illumina. (2017). illumina.com. Von [https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry\\_documentation/samplepreps\\_truseq/truseq-dna-pcr-free-workflow/truseq-dna-pcr-free-workflow-reference-1000000039279-00.pdf](https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/samplepreps_truseq/truseq-dna-pcr-free-workflow/truseq-dna-pcr-free-workflow-reference-1000000039279-00.pdf)

### Abbildungen

- Abb. 1 Ergebnisse Projekt 1A (Proben 1-30) (Imadjane, 2021)  
Abb. 2 Ergebnisse Projekt 3 (Proben 1-25) (Imadjane, 2021)

Hintergrund: DNA-Strang (Imadjane, 2021)