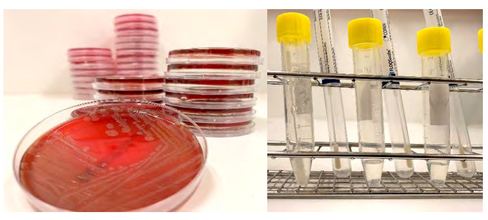
NEXT GENERATION SEQUENCING AM INSTITUT FÜR HYGIENE UND UMWELT (NGS@HU)

Die Methodik des *Next Generation Sequencing* (NGS) oder auch *Massive Parallel Sequencing* (MPS) wird am Institut für Hygiene und Umwelt (HU) innerhalb des NGS-Labors (NGS@HU) etabliert und angewandt. Im täglichen Routinebetrieb wird dieses Labor den drei Fachbereichen, HU2 (Lebensmittelsicherheit und Zoonosen), HU3 (Medizin und Hygiene) und HU4 (Umweltuntersuchungen) für die Auswertung spezifischer Fragestellungen wie beispielsweise zur Untersuchung von Lebensmitteln, für die Typisierung von bakteriellen und viralen Krankheitserregern sowie bei der Untersuchung von Umweltproben zur Verfügung stehen. Angewandte Methoden umfassen dabei sowohl das *Wetlab*, bei dem mittels molekularbiologischer Arbeiten sequenzierbare DNA-Bibliotheken erstellt werden (*Library prep*) als auch das *Drylab*, bei dem rechnergestützte Arbeitsprozesse (*Pipelines*) implementiert und mittels *High Performance Computing* (HPC) durchgeführt werden. Abseits des Routinebetriebs steht das NGS-Labor auch bei kurzfristigen Fragestellungen zur Verfügung, um im Krisenfall (z.B. Ausbruchsgeschehen) zur schnellen Risikoabschätzung, Verbreitung und Nachverfolgung (Aufklärung von Infektionsketten) aus eigener Kraft beizutragen.

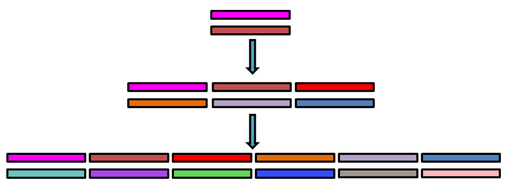
Arbeitsabläufe bei NGS@HU

I - Probeneingang und Erstellung von DNA-Bibliotheken *(Wetlab)*



Nukleinsäure-Isolation

Qualitäts-Kontrolle



Erstellung von DNA-Bibliotheken

II - Allgemeine Schritte bei der Erstellung von DNA-Bibliotheken

1. Tagmentierung der DNA

Bei der On-Bead-Tagmentierung wird doppelsträngige DNA (dsDNA) mit Bead-gekoppelten Transposons in einheitliche Fragmente fragmentiert (300 – 350 bp). Danach erfolgt eine Aufreinigung über Magnetbeads, bei der gebundene Fragmente von nicht gebundenen getrennt werden.

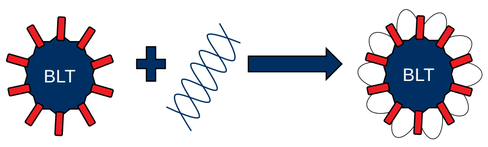


Abb. 1: On-Bead-Tagmentierung. Die dsDNA bindet an die Bead-gekoppelten Transponsons und wird tagmentiert.

2. Ligation der Indizes

Durch unterschiedliche Indexadapter können mehrere Proben in einem Ansatz vereinigt (*multiplexing*) und parallel sequenziert werden, da jede Probe spezifisch markiert ist.

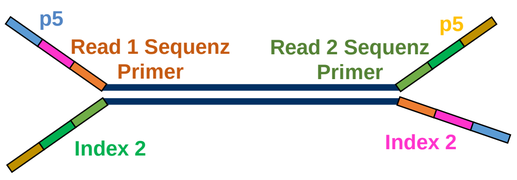


Abb. 2: Finales Fragment mit p5- und p7-Adapter nach Indexligation. Das finale Fragment nach Ligation der Indizes dient der Unterscheidung einzelner Proben sowie der Primerbindestellen der reads (R1 und R2).

3. Amplifikation von Zielregionen

Eine Amplifikation der Zielregionen führt zu einer deutlichen Erhöhung der gesuchten DNA-Abschnitte. Durch eine anschließende Reinigung wird eine qualitativ hoch-spezifische Bibliothek erzielt.

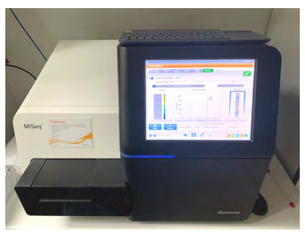
4. Quantifizierung mittels Qubit™

Die Bestimmung der Eingangs-konzentrationen einzelner Proben sowie die der Bibliotheken erfolgt über Fluoreszenzmessung. So wird eine einheitliche Molarität der finalen Bibliothek sichergestellt.

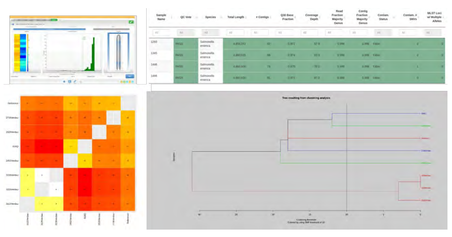
5. Denaturierung und Verdünnung der finalen Bibliothek

Nachdem die einzelnen Bibliotheken auf eine einheitliche Molarität vereinigt und denaturiert wurden, liegt die finale Bibliothek für die Sequenzierung einzelsträngig (ssDNA) vor. Abschließend erfolgt ein methodenspezifischer Verdünnungsschritt.

III - Sequenzierung und Bioinformatik *(Drylab)*



Sequenzierung (Illumina MiSeq™)



Rechnergestützte Analytik (Bioinformatik-Pipelines)

IV - Parameter der Sequenzierung (Illumina MiSeq™)

	MiSeq Kit v2 Micro	MiSeq Kit V2		MiSeq Kit V3	
Leselänge	2x 150 bp	2x 150 bp	2x 250 bp	2x 75 bp	2x 300 bp
Lesedauer	19 h	24 h	39 h	21 h	56 h
Output	1,2 Gb	4,5 - 5,1 Gb	7,5 - 8,5 Gb	3,3 - 3,8 Gb	13,2 - 15 Gb
Single Reads	4 Mio	12 - 15 Mio		22 - 25 Mio	
Paired-End Reads	8 Mio	24 - 30 Mio		44 - 50 Mio	
Clusters PF*	4 Mio	13 - 14 Mio	12 - 14 Mio	23 - 25 Mio	22 - 25 Mio

* PF *Passing Filters pro Fließzelle*

V - Qualitätskontrolle mittels Fluorometermessung#

Assay	Detektionsbereich [Assay]	Konzentrationsbereich [Probe]
Qubit dsDNA HS (High Sensitivity)	0,2 - 100 ng	10 pg /µL - 100 ng / µL
Qubit dsDNA BR (Broad Range)	2 - 1.000 ng	100 pg /µL - 1 µg / µL
Qubit ssDNA	1 - 200 ng	50 pg /µL - 200 ng / µL
Qubit RNA	5 - 100 ng	250 pg /µL - 100 ng / µL
Qubit RNA BR	20 - 1.000 ng	1 ng /µL - 1 µg / µL
Qubit Protein	0,25 - 5 µg	12,5 µg / ml - 5 mg / ml

#Je nach Fragestellung wird bei Probeneingang die Quantität der DNA bzw. RNA fluorometrisch bestimmt. Ebenso wird nach DNA-Bibliothekserstellung die DNA-Konzentration ermittelt, um für die Sequenzierung eine einheitliche und methodenspezifische Molarität zu gewährleisten.

VI - Angewandte Bioinformatik bei NGS@HU

Die rechnergestützten Analysen der Sequenzdatensätze basieren auf angewandten bioinformatischen Arbeitsprozessen (*Pipelines*), die in einer Linux-Umgebung automatisiert ablaufen. Bei diesen Arbeitsprozessen werden *open source*-Anwendungen und eigene Entwicklungen eingesetzt.

NGS-LABOR (NGS@HU)

SEQUENZIERUNG

Institut für Hygiene und Umwelt
Hamburger Landesinstitut für Lebensmittelsicherheit, Gesundheitsschutz und Umweltuntersuchungen

Hamburg