



Ministerstwo
Zdrowia



NARODOWY
INSTYTUT
ZDROWIA
PUBLICZNEGO
PAŃSTWOWY INSTYTUT
BADAWCZY



Współfinansowane przez
Unię Europejską

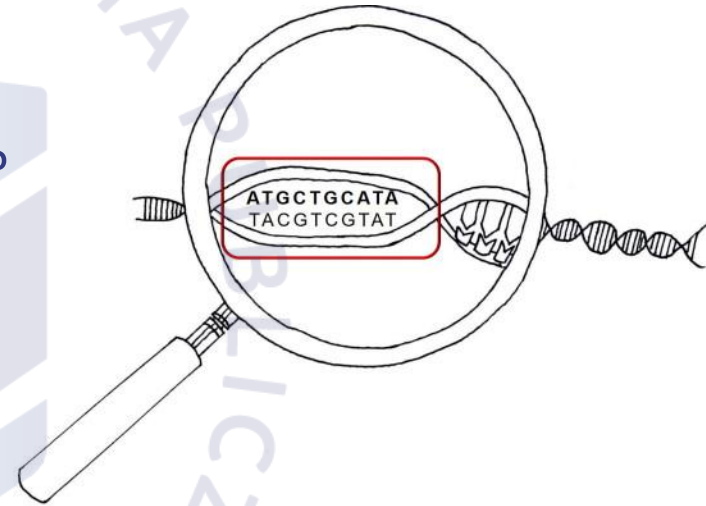
Wprowadzenie do praktycznych aspektów sekwencjonowania pełnogenomowego

dr n. med. Tomasz Wołkowicz
twolkowicz@pzh.gov.pl

„Towards the National Platform for Genomic Surveillance” PLEpiSeq is co-funded by the European Union and the Ministry of Health of the Republic of Poland. Views and opinions expressed are however those of the author(s) only and do not necessarily reflect those of the European Union or the European Health and Digital Executive Agency. Neither the European Union nor the granting authority can be held responsible for them.

„Towards the National Platform for Genomic Surveillance” PLEpiSeq współfinansowany ze środków Unii Europejskiej oraz Ministerstwa Zdrowia Rzeczypospolitej Polskiej. Wyrażone poglądy i opinie są jednak wyłącznie poglądami autora (autorów) i niekoniecznie odzwierciedlają poglądy Unii Europejskiej lub Europejskiej Agencji Wykonawczej ds. Zdrowia i Cyfryzacji. Unia Europejska ani organ przyznający pomoc nie mogą być za nie pociągnięte do odpowiedzialności.

- Co to jest sekwencjonowanie pełnogenomowe?
- Czy sekwencjonowanie pełnogenomowe jest „pełnogenomowe”?
- Czym różni się WGS od WES czy sekwencjonowania amplikonowego czy metagenomiki?



WGS – sekwencjonowanie kompletnego,
pofragmentowanego genomu
(namnożonego wcześniej, np. hodowla)

Odczyty → contigi

Σ contigów $\approx$ pełny genom

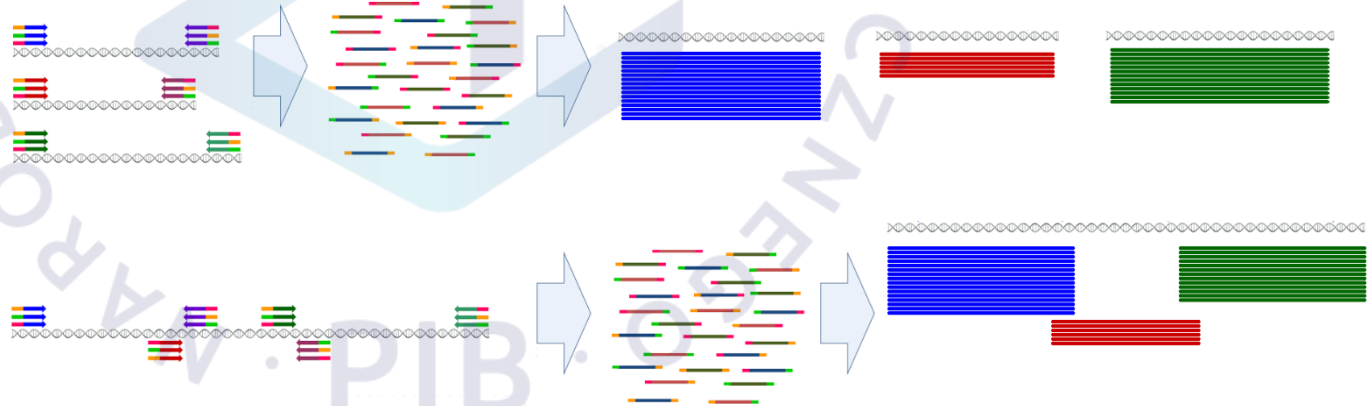


Im krótsze fragmenty tym trudniej poskładać kompletny, domknięty genom
(problem sekwencji repetytywnych)

Sekwencjonowanie ampikonowe

„namnażanie” genomu do sekwencjonowania w reakcjach PCR

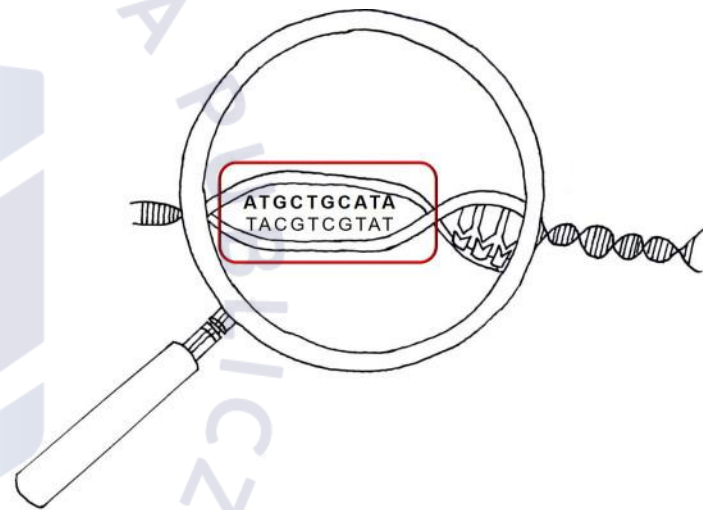
Σ fragmentów $\approx \pm$ pełny genom – (flanki + startery)



Sekwencjonowanie metagenomowe

sekwencjonowanie kompletnego DNA z próbki
materiału
(klinicznego, środowiskowego etc)

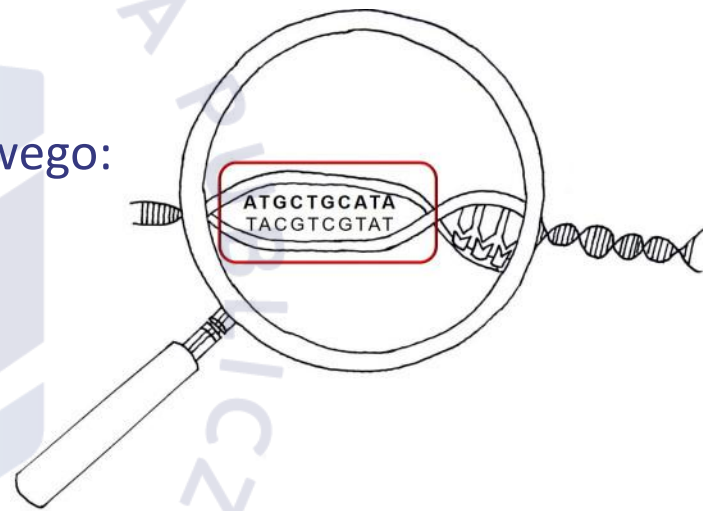
Σ fragmentów = fragmenty wszystkich genomów



Inne rodzaje sekwencjonowania wysokoprzepustowego:

Sekwencjonowanie transkryptomu

Sekwencjonowanie WES

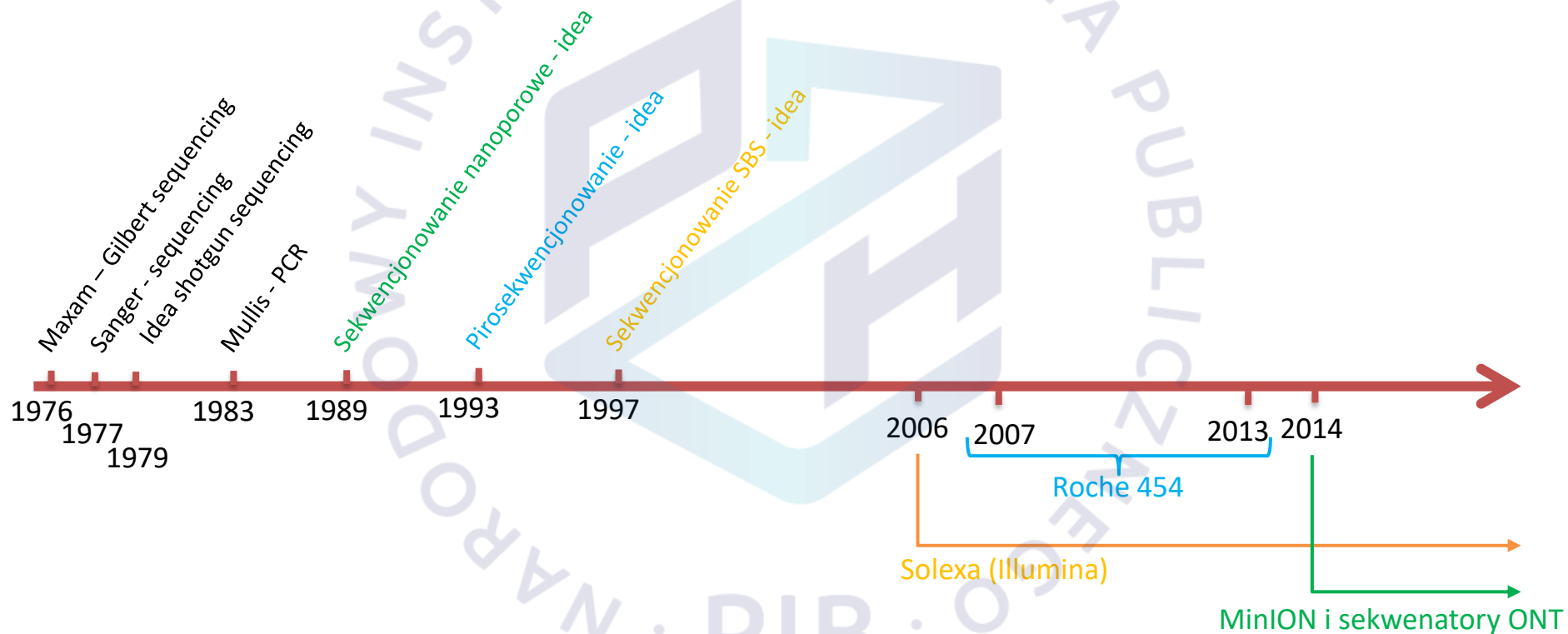


Ogólny schemat protokołów konstrukcji bibliotek

- Wejściowe DNA – kwantyfikacja, analiza jakości
- Wstępna obróbka DNA
- Ligacja odpowiednich sekwencji adapterowych oraz sekwencji znakujących (indeksowanie)
- Oczyszczanie bibliotek
- Przygotowanie połączonych bibliotek do sekwencjonowania

Technologie WGS





Illumina

Sekwencjonowanie przez syntezę (SBS)

Wysoka jakość sekwencji ($Q > 30$)

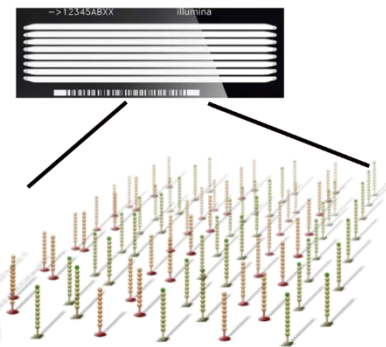
Wystandaryzowane protokoły (w tym dry-lab)

Dużo producentów chemii do bibliotek

Wysokie(?) koszty aparatu i/lub sekwencjonowania

Pracochłonne protokoły

Krótkie odczyty (150 nt)



Oxford Nanopore Technologies

Sekwencjonowanie poprzez bezpośrednie „czytanie” sekwencji w trakcie przechodzenia przez por.

Niskie koszty aparatu i sekwencjonowania

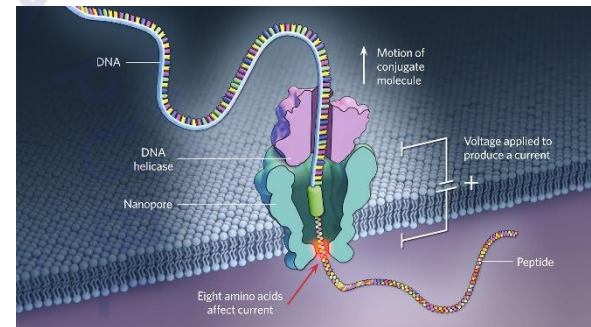
Proste protokoły przygotowania bibliotek i sekwencjonowania

Długie odczyty

Umiarkowana jakość sekwencji (Q 20)

Nieprzewidywalne flow-celle i trudny dry-lab

Głównie odczynniki producenta



IonTorrent, PacBio, BGI, Aviti... i wiele innych

Warto śledzić rynek. Wśród ciekawych nowości:

- Roche – SBX technology (w opracowywaniu)
- PacBio:
 - Onso (120GB, 150nt)
 - Vega (50Gb, 5-20kb)
- Aviti24 Teton

Ale – uważnie czytać parametry i krytycznie rozmawiać z firmami



Marketing vs realne potrzeby

Illumina:

- Wysokie koszty aparatu i/lub sekwencjonowania
- **Pracochłonne protokoły**
- **Wysoka jakość sekwencji (Q >30)**
- **Wystandaryzowane protokoły**
- Dużo producentów chemii do bibliotek
- **Krótkie odczyty (150 nt)**

Nanopore:

- Niskie koszty aparatu i sekwencjonowania
- **Proste protokoły przygotowania bibliotek i sekwencjonowania**
- **Umiarkowana jakość sekwencji (Q 20)**
- Słabo wystandaryzowane protokoły i trudny dry-lab
- Głównie odczynniki producenta
- **Długie odczyty**

Krytyczna analiza technologii - „ukryte” koszty

Przykład: PacBio Onso:

- Library preparation kit x96 – 22 500 pln
- Adapter plate x96 – 4 500 pln
- Onso library quant kit x500 – 6 000 pln
- Wash cartridge set (4 płukania) – 9 200 pln

Illumina:

- MiSeq i100 $\approx$ 600 tys zł
- NextSeq 1000 $\approx$ 1 600 tys zł
- NextSeq 2000 $\approx$ 2 600 tys zł
- Biblioteki x90: 20 000 zł = 222 zł / 111 zł
- Indeksy x96: 3 000 zł = 31zł / 16 zł
- Flow-cell (x30): 12 500 = 416 zł
- Flow-cell (x96): 6600 zł = 74 zł
- Flow-cell (x96): 4300 zł = 48 zł
- Razem: 670 zł – 175zł (osiągalne 116zł)

Nanopore:

- MinION Mk 1d – 3000 \$ (12 tys zł)
 - + komputer
- GridION – 60 000 \$ (240 tys zł)
- Biblioteki x96 (x48): 5 200 zł = 106 zł
- Priming kit: 950 zł = 20 zł
- Wash kit: 950 zł
- Flow-cell (x12): 2 500 zł = 208 zł
- Razem: $\approx$ 335 zł

Genomika w nadzorze epidemiologicznym



- Charakteryzowanie istotnych klinicznie – epidemiologicznie cech patogenu (oporność, wirulencja, poszerzone typowanie)
- Klasteryzacja / filogenetyka – wykrywanie i pogłębiona analiza ognisk

Genomika nie odpowie na **wszystkie** pytania!

Genomika nie odpowie na **niezadane** pytania!

SARS-CoV-2	Wirusy grypy	RSV	Salmonella	Campylobacter	VTEC (E. coli)
Statystyki sekwencjonowania	Statystyki sekwencjonowania	Statystyki sekwencjonowania	Statystyki sekwencjonowania	Statystyki sekwencjonowania	Statystyki sekwencjonowania
Wariant	Typ		Potwierdzenie gatunku	Potwierdzenie gatunku	Potwierdzenie gatunku
Lista kluczowych mutacji	Typ H		Serotyp		Serotyp
Linia PANGO	Typ N		7g MLST	7g MLST	7g MLST
Linia NextClade	Mutacje warunkujące oporność		cgMLST	cgMLST	cgMLST
Clade GISAID			Plazmidy	Plazmidy	Plazmidy
			Geny oporności	Geny oporności	Geny oporności
			Mutacje oporności	Mutacje oporności	Mutacje oporności
					Patotyp
					Najważniejsze geny wirulencji
					Inne geny wirulencji
Klasteryzacja	Klasteryzacja	Klasteryzacja	Klasteryzacja	Klasteryzacja	Klasteryzacja

Technologie a realne potrzeby

- Jakość odczytu:
Czy Q50 faktycznie jest lepsze niż Q20?
- Długość odczytu:
Czy sekwencjonowanie kbp jest lepsze niż 150bp?

Dziękuję za uwagę

„Towards the National Platform for Genomic Surveillance” PLEpiSeq is co-funded by the European Union and the Ministry of Health of the Republic of Poland.
Views and opinions expressed are however those of the author(s) only and do not necessarily reflect those of the European Union or the European Health and Digital Executive Agency. Neither the European Union nor the granting authority can be held responsible for them.

„Towards the National Platform for Genomic Surveillance” PLEpiSeq współfinansowany ze środków Unii Europejskiej oraz Ministerstwa Zdrowia Rzeczypospolitej Polskiej.
Wyrażone poglądy i opinie są jednak wyłącznie poglądami autora (autorów) i niekoniecznie odzwierciedlają poglądy Unii Europejskiej lub Europejskiej Agencji Wykonawczej ds. Zdrowia i Cyfryzacji. Unia Europejska ani organ przyznający pomoc nie mogą być za nie pociągnięte do odpowiedzialności.