

Il wetlab: protocolli analitici per la preparazione delle librerie genomiche

Roma, 26 Ottobre 2021



Bianca Maria Varcasia

UOC Microbiologia degli Alimenti
Lab. Biotecnologia Applicate agli Alimenti

Katia Spinella

UOSD Ricerca e controllo degli organismi
geneticamente modificati





PAROLE CHIAVI

- NGS
- WETLAB
- LIBRERIE
- WORKFLOW PER LA PREPARAZIONE DELLE
LIBRERIE GENOMICHE



Wetlab o Wet Laboratory



NGS

(New-generation sequencing)

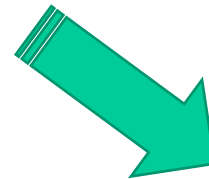
Serie di tecnologie di sequenziamento ad alta resa che permettono di sequenziare moltissimi frammenti in parallelo in tempo ristretto

Applicazioni:

- sequenziamento dell'intero genoma
- analisi/metagenomica del microbioma
- profilo del trascrittoma
- diagnosi di malattie infettive
- scoperta di patogeni
- sorveglianza della salute pubblica

(Fonte: Gargis et al. 2016)

È un laboratorio in cui microrganismi, prodotti chimici, farmaci o altre sostanze biologiche vengono analizzati utilizzando l'acqua.



LIBRERIE

Insieme di frammenti di acido nucleico (DNA o RNA) ottenuto dalla frammentazione con metodi meccanici o enzimatici ai quali vengono agganciate gli “adattatori” (sequenze predefinite necessarie per ancorare e immobilizzare i frammenti al supporto sul quale avrà luogo la reazione di sequenziamento)





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

COME SI PREPARA UNA LIBRERIA?



**Isolamento
batterico**



Ceppo di *Listeria monocytogenes* su Listeria (Oxford) Agar

Estrazione DNA



**Quantificazione
DNA**



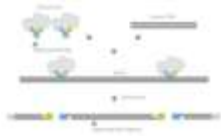
Dal ceppo.....al gDNA!



COME SI PREPARA UNA LIBRERIA?



Tagmentazione



Fonte: Illumina Nextera XT Tagmentation Process

Amplificazione



**Quantificazione,
controllo di qualità
e normalizzazione**



Dal gDNA.....alle librerie!



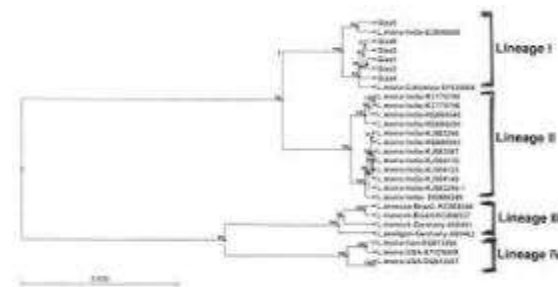
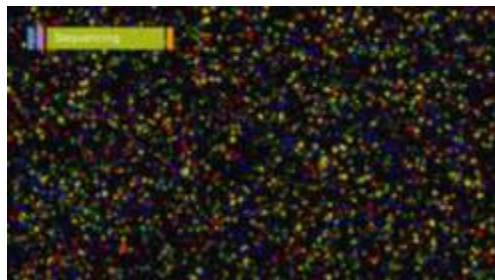


Dalle librerie.....ai risultati!

Sequenziatore

Analisi dei dati

Risultati

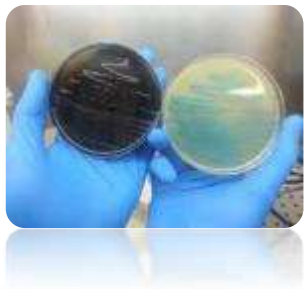


Isolamento batterico

(Fonte: LNR per *Listeria monocytogenes*)

Per avere un buon materiale di partenza è necessario:

- Ridurre il rischio di contaminazione, degradazione del campione ed errata identificazione
- Ridurre al minimo la probabilità di cambiamenti genetici (perdita di plasmidi o polimorfismi introdotti attraverso i passaggi di purificazione)
- Non effettuare più di 5 passaggi per ogni singola colonia in terreni specifici per il ceppo in esame
- In caso di isolati nei quali son presenti plasmidi è consigliabile collezionare 2 o al massimo 3 replicati.
- Garantire la purezza dell'isolato e confermare le specie con test specifici
- Conservare adeguatamente gli isolati batterici (es: -80°C in microbank)





Il metodo utilizzato deve tenere conto:

- tipo di cellula (Gram positivo o negativo)
- la fase di crescita
- il terreno di coltura
- la piattaforma di sequenziamento utilizzata



Estrazione automatizzata con biglie magnetiche

*Acidi nucleici di alta qualità privi di proteine,
nucleasi e altre impurità*



Quantificazione DNA

FLUORIMETRO

Strumento che quantifica il materiale genetico (RNA o DNA) in modo accurato, utilizzando intercalanti fluorescenti in grado di legarsi in modo aspecifico al DNA/RNA, generando una fluorescenza rilevabile



Fonte: <https://www.thermofisher.com>

$[\text{DNA}]_f$ = tra 1,8 e 2,8 ng/ μl

La $[\text{DNA}]_f$ da utilizzare nella preparazione delle librerie è di **1ng**



PERCHE' E' IMPORTANTE $[\text{DNA}]_f$ DA UTILIZZARE NELLA PREPARAZIONE DELLE LIBRERIE?

- $[\text{DNA}]_f$ dipende: dal tipo di studio e dal tipo di librerie da preparare
- Una maggiore quantità di DNA iniziale implica una minore necessità di amplificazione e di conseguenza la maggiore probabilità di avere diverse sequenze, rappresentative del genoma di partenza



Tagmentazione (METODO ENZIMATICO: "Trasposasi")

Frammentazione del gDNA
e il legame dei frammenti
con gli "adattatori" (Index
Adapter)

FASI

Frammentazione del gDNA

Attacco degli Index Adapter

Reazione di amplificazione

Fase di "Cleanup"

- Ottenere una miscela di librerie di dimensioni simili
- Utilizza delle microsfere di magnetite rivestite di un primo strato di polistirolo ed un secondo di polimero carbossilato modificato, il quale favorisce l'attacco del DNA
- Variando il rapporto librerie/microsfere, varia la libreria che si lega

- Dimensione dei frammenti: 300 bp



- "Trasposasi" enzimi che consentono lo spostamento all'interno dei genomi dei "trasposoni", elementi genetici capaci di muoversi lungo il genoma
- Index Adapter: sequenze oligonucleotidiche utilizzate per identificare in modo univoco i frammenti di DNA

Hold	72°C x1'	12 cycles
Denaturing	95°C x30"	
Denaturing	95°C x10"	
Annealing	55°C x30"	
Extention	72°C x30"	
Final extension	72°C x5'	
Hold	10°C x ∞	

Protocollo

- Miscela di "frammentazione"

Tagment DNA Buffer (TD) 10 µl
Amplicon Tagment Mix (ATM) 5 µl
DNA 5 µl

- Selezionare accuratamente gli Index Adapter (Index Adapter 1 e Index Adapter 2)
- Aggiungere 5 µl di ciascun Index
- Aggiungere 15 µl di Nextera PCR Master Mix (NPM)
- Centrifugare a 280 × g (20°C) x 1 minuti



(Fonte: <https://upcvmda-pl480.weebly.com/http://core-genomics.blogspot.com/2012/04/how-do-spr-beads-work.html>)

(Fonte: Nextera XT DNA Library Prep Kit Reference Guide)

Quantificazione e controllo di qualità delle librerie



Prima di procedere al caricamento dello strumento è importante considerare:

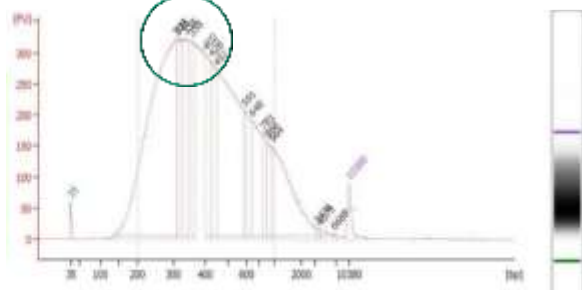
- le dimensioni delle librerie (librerie più corte vengono sequenziate preferibilmente a discapito di quelle più lunghe)
- la concentrazione delle librerie

VALUTAZIONE DIMENSIONI LIBRERIE (insert size)



Elettroforesi capillare su chip

Insert size



CONCENTRAZIONE LIBRERIE



Normalizzazione delle librerie



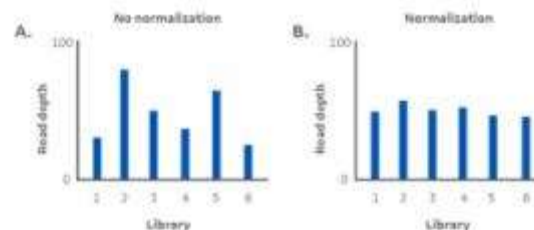
COS'E' LA NORMALIZZAZIONE?

La normalizzazione è il processo mediante il quale tutte le librerie sono portate alla stessa concentrazione

COME SI NORMALIZZANO LE LIBRERIE?

- Utilizzando le biglie magnetiche
- Utilizzando un foglio di calcolo

(Fonte: POS DIG 037 int)



Tutte le librerie possono essere unite in un unico pool e sono equamente rappresentate nella flow cell

La normalizzazione ha un effetto diretto:

- sull'efficienza del clustering
- sull'amplificazione clonale
- sull'uniformità di lettura tra le librerie presenti nel pool

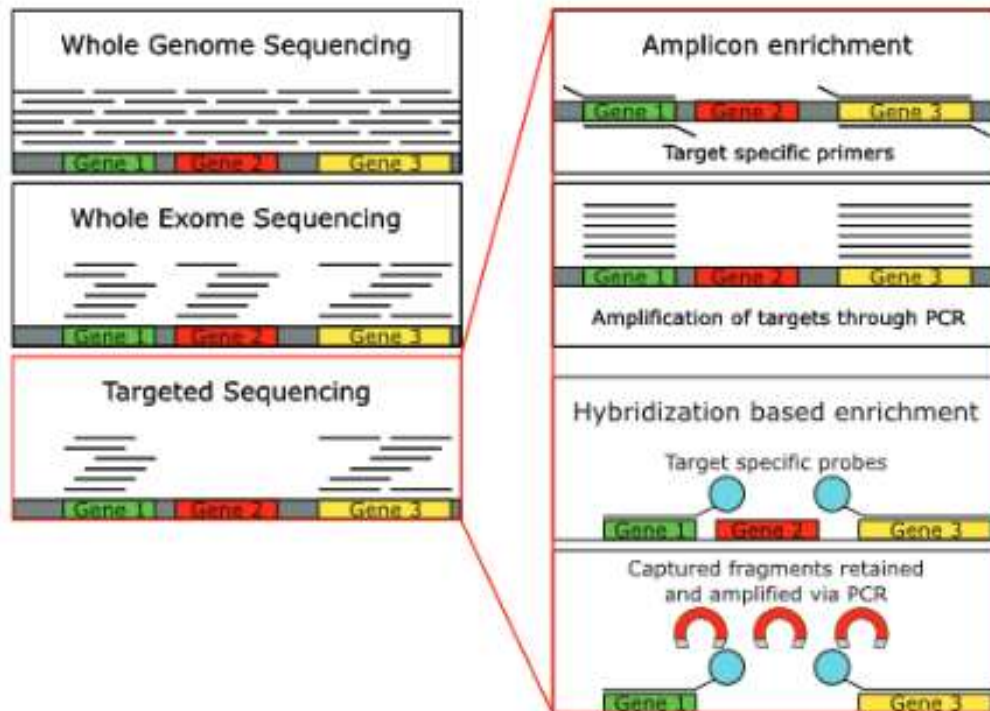
(Fonte: <https://www.cytivalifesciences.com>)



1. PREPARAZIONE DEL POOL: tutte le librerie normalizzate vengono unite a formare un pool per poter essere sequenziate in un'unica flow cell;
2. LETTURA DELLA CONCENTRAZIONE POOL (fluorimetro) E SCELTA DELLA CONCENTRAZIONE FINALE DELLA LIBRERIA (concentrazione da caricare nel sequenziatore)
3. DENATURAZIONE DEL POOL: rottura del doppio filamento con conseguente formazione dei filamenti singoli. Questa fase permette il legame dei filamenti singoli agli oligo immobilizzati nella flow cell (gli oligo sono complementari alle sequenze P5 e P7 presenti negli Index Adapter);
4. DILUIZIONE DEL POOL
5. CARICAMENTO DELLO STRUMENTO



Targeted sequencing

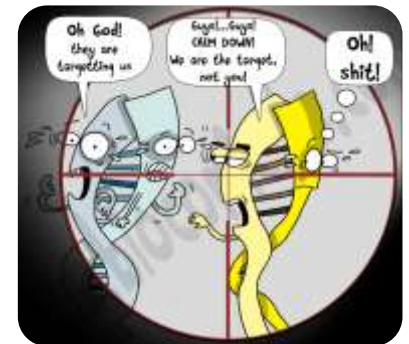


Copley et al, 2019



Applicazioni targeted sequencing

- ❑ Metagenomica; 16s rRNA
- ❑ Detection di varianti a bassa frequenza (<1%) (mutazioni somatiche rare..)
- ❑ Identificazioni di alleli rari associati a patologie ereditarie, SNP
- ❑ Identificazioni di OGM non autorizzati (enrichment sequencing)



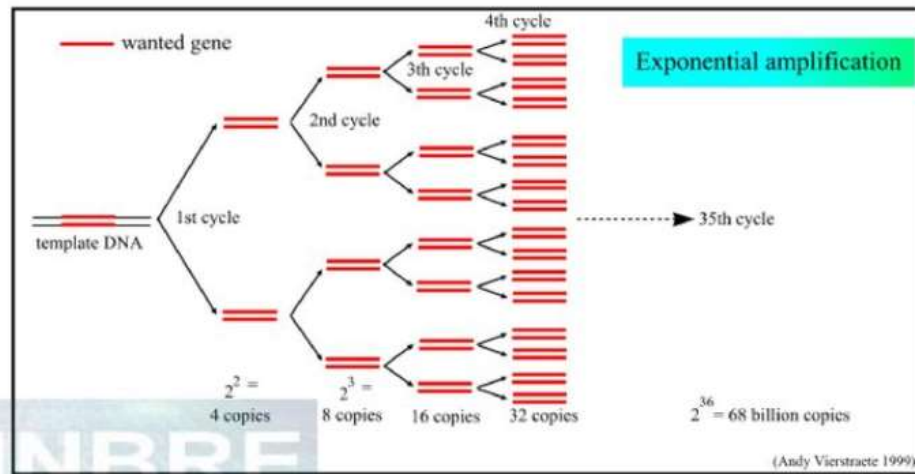
Vantaggi e Svantaggi

	Advantages	Disadvantages
Targeted sequencing	<ul style="list-style-type: none">• Needs smaller amounts of DNA• Supports some discovery• Provides enough coverage and sequencing depth to allow for detection of subclonal variants• Many commercially available panels• Cheaper, faster, simpler	<ul style="list-style-type: none">• Evaluates a limited and pre-defined number of genes



Amplicon sequencing

Il principio alla base del sequenziamento degli ampliconi è l'uso di primer per "amplificare" sequenze di regioni evolutivamente omologhe e corte di genomi di interesse o regioni target.



Esempi di kit commerciali per sequenziare target di interesse clinico

- Sequencing
 For Research Use Only
 DNA
AmpliSeq for Illumina BRCA Panel
 Targeted research panel investigating somatic and germline variants in BRCA1 and BRCA2.
- Sequencing
 For Research Use Only
 DNA
AmpliSeq for Illumina Cancer Hotspot Panel v2
 Targeted research panel investigating hotspot regions of 50 genes with known associations to cancer.
- Sequencing
 For Research Use Only
 DNA / RNA
AmpliSeq for Illumina Childhood Cancer Panel
 Targeted panel for investigating 203 genes associated with cancer in children and young adults.
- Sequencing
 For Research Use Only
 DNA
AmpliSeq for Illumina Comprehensive Cancer Panel
 Targeted panel investigating the exonic regions of 409 genes with known associations to cancer.

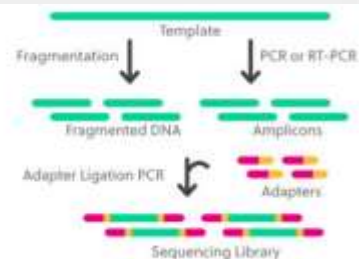


Overview; NGS workflow

STEP 1: Extraction



STEP 2: Library Prep



STEP 3: Sequencing

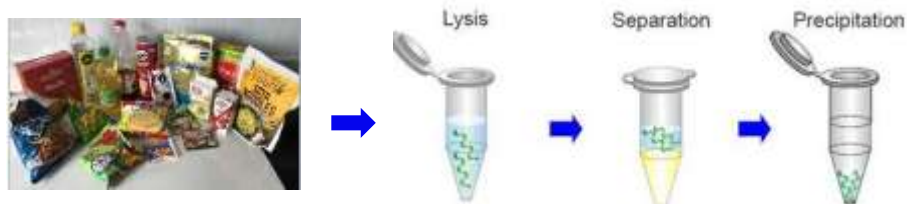


STEP 4: Analysis

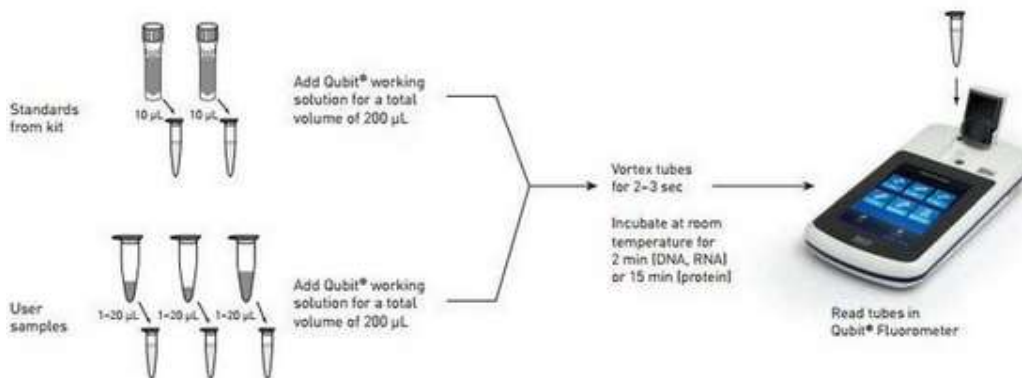


Step 1 Estrazione del DNA e quantificazione

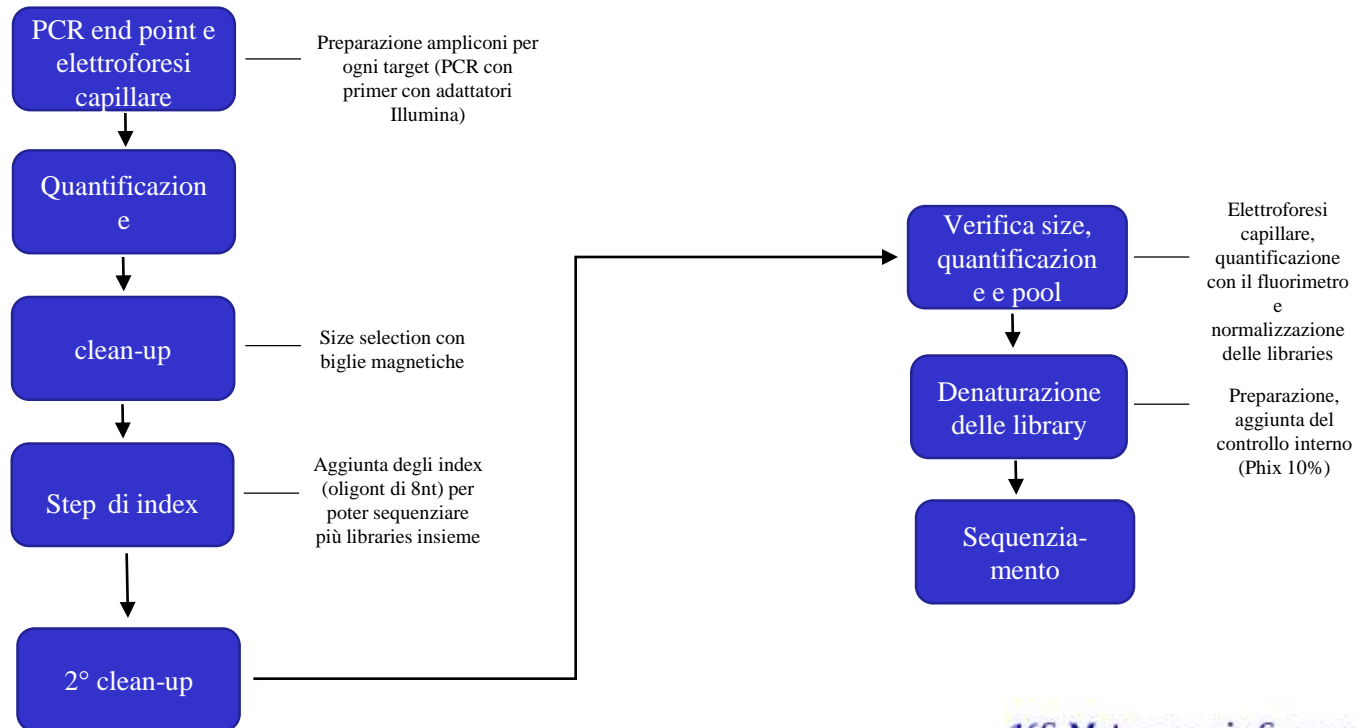
Estrazione del DNA



Quantificazione



Step 2 Preparazione delle libraries



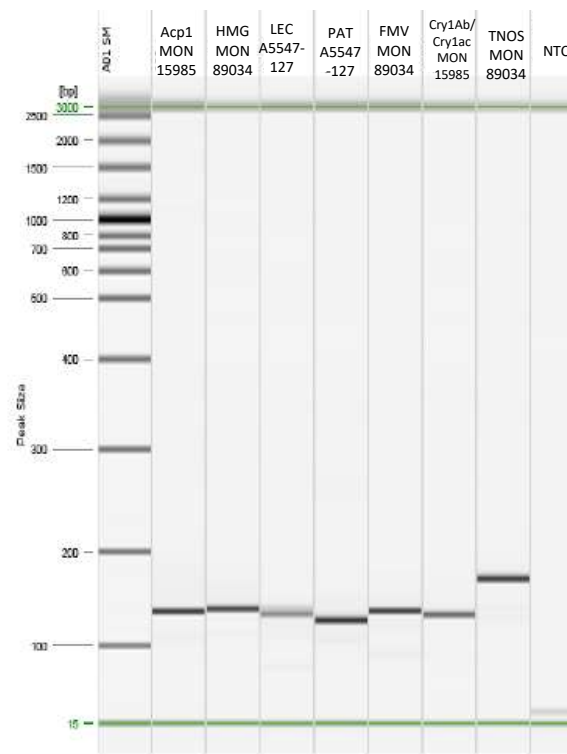
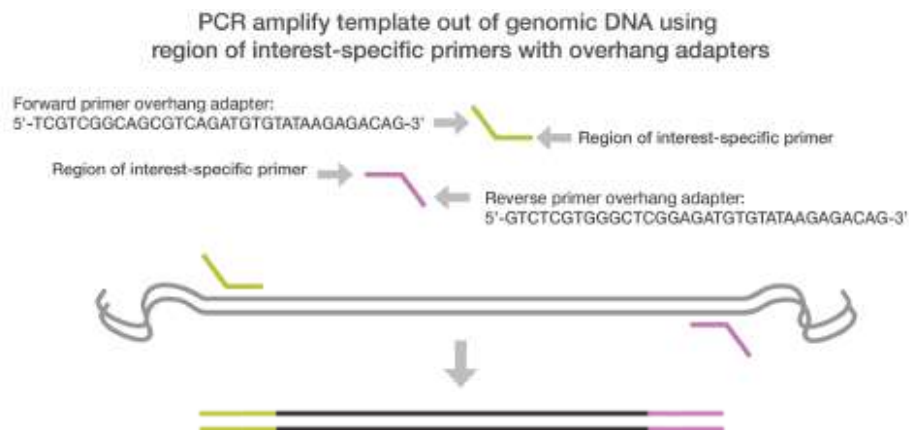
- Gli index consentono di risalire al campione da cui proviene l'amplicone
- Gli adattatori consentono il legame con la flow cell

16S Metagenomic Sequencing Library Preparation

Preparing 16S Ribosomal RNA Gene Amplicons for the Illumina MiSeq System



PCR end-point; preparazione ampliconi



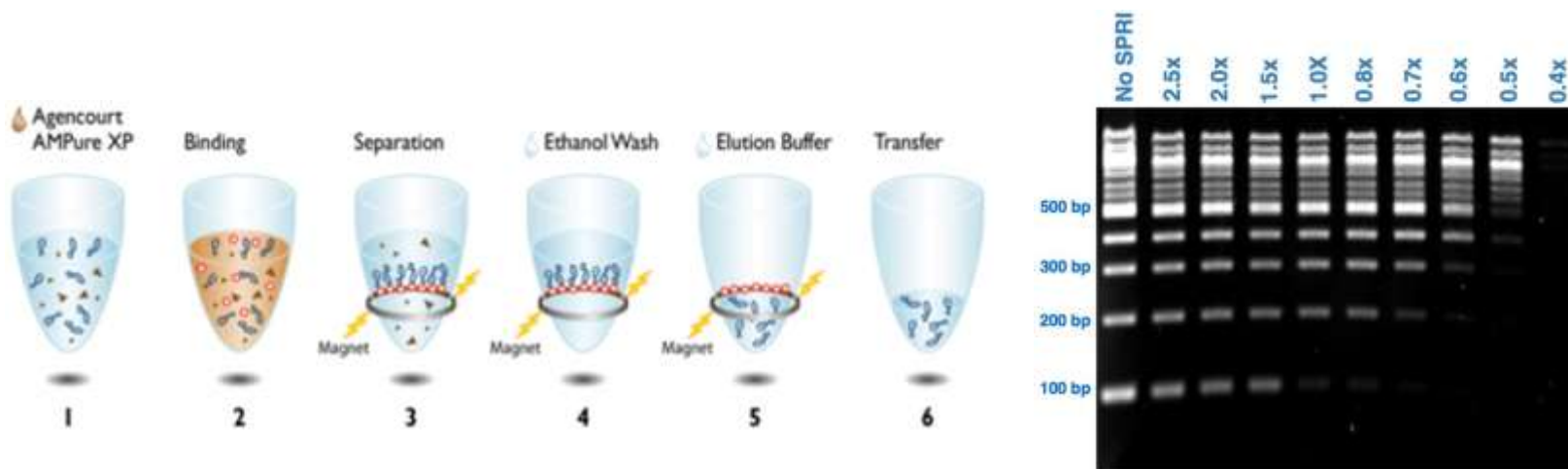
Elettroforesi capillare

Con questo step aggiungiamo alle estremità dell'amplicone gli adattatori per i primer di sequenziamento



Clean-up con biglie magnetiche

Solid Phase Reversible Immobilization (SPRI) Methodology

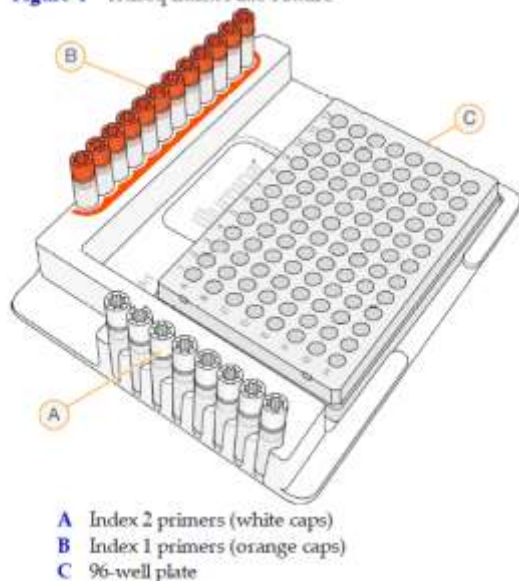


Ratio beads/volume di DNA



Step PCR-index

Figure 4 TruSeq Index Plate Fixture

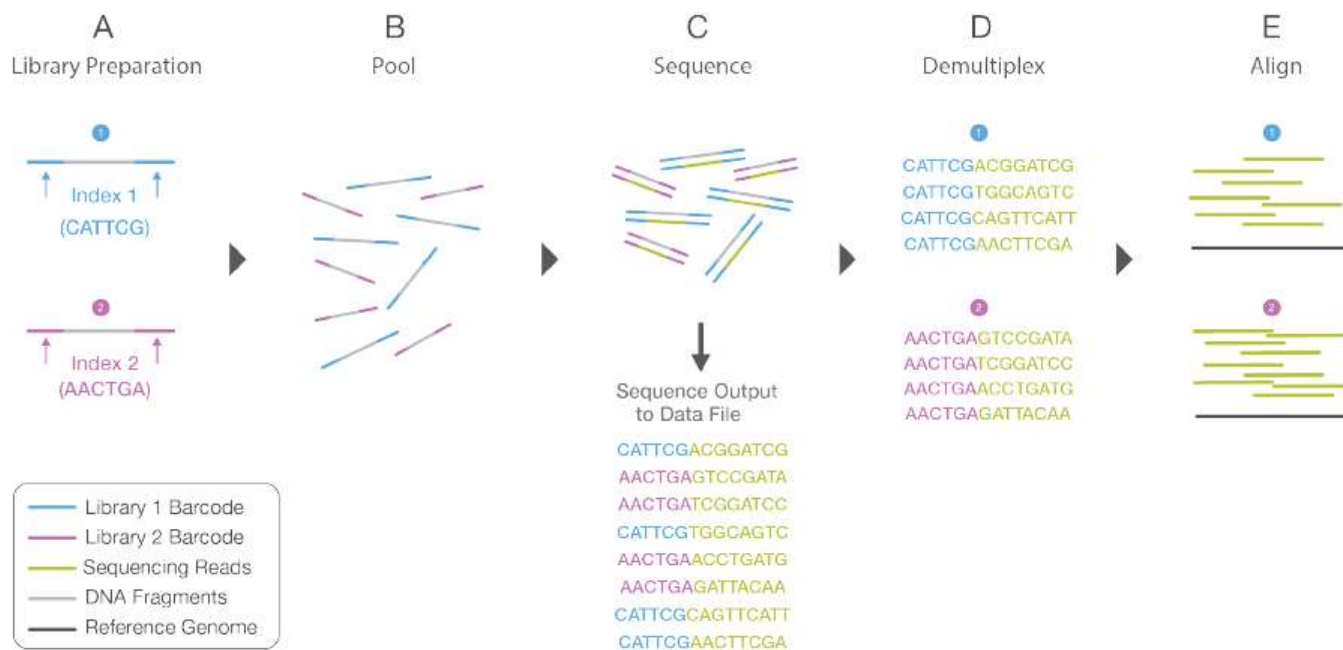


Index 1 (I7)	Sequence	Index 2 (I5)	Sequence
N701	TAAGGCGA	5501	TAGATCGC
N702	CGTACTAG	5502	CTCTCTAT
N703	AGGCAGAA	5503	TATCCTCT
N704	TCCTGAGC	5504	AGAGTAGA
N705	GGACTCCT	5505	GTAAGGAG
N706	TAGGCATG	5506	ACTGCATA
N707	CTCTCTAC	5507	AAGGAGTA
N708	CAGAGAGG	5508	CTAAGCCT
N709	GCTACGCT		
N710	CGAGGCTG		
N711	AAGAGGCA		
N712	GTAGAGGA		

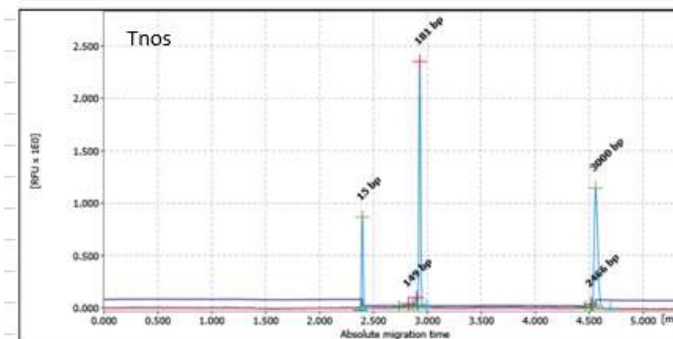
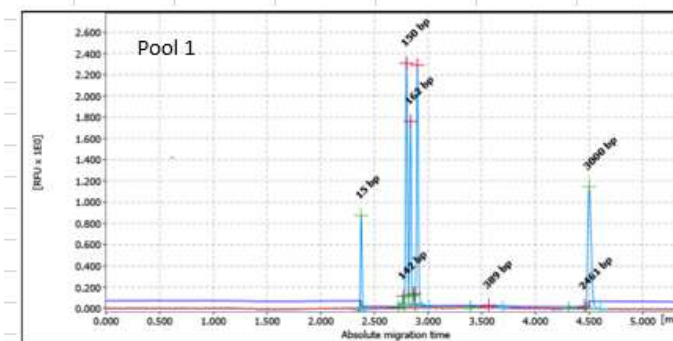
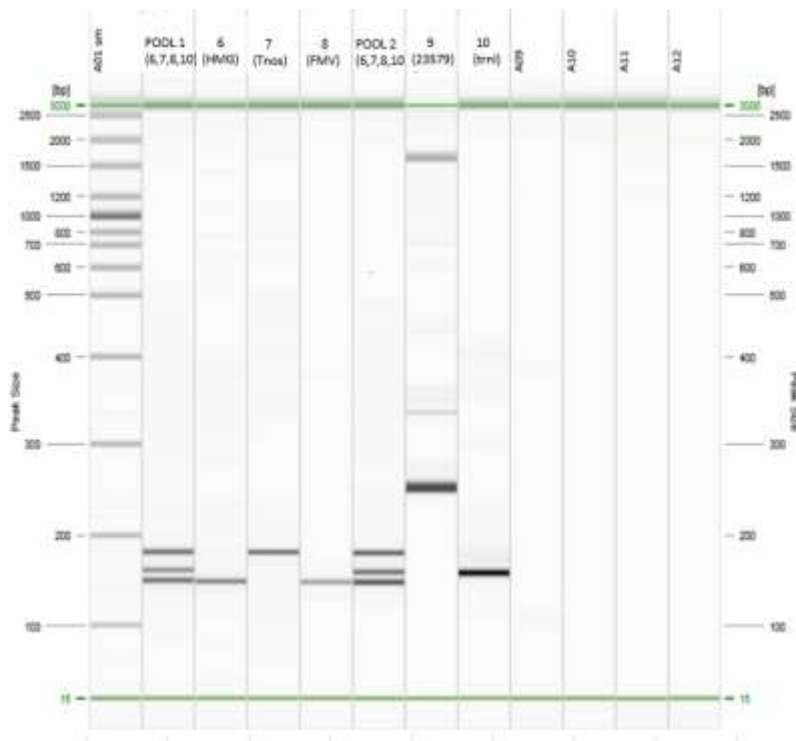
Con questo step aggiungiamo alle estremità dell'amplicone gli indici (index) e gli adattatori per la flow cell (P5 e P7)



Grazie agli index è possibile analizzare un grande numero di campioni simultaneamente



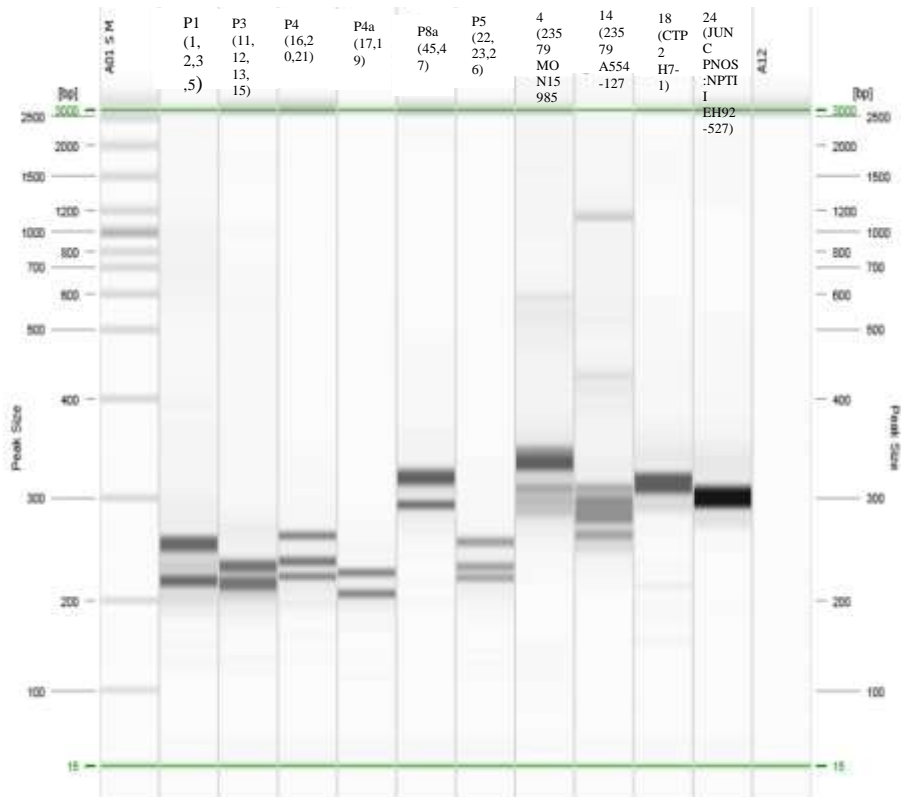
Verifica insert size



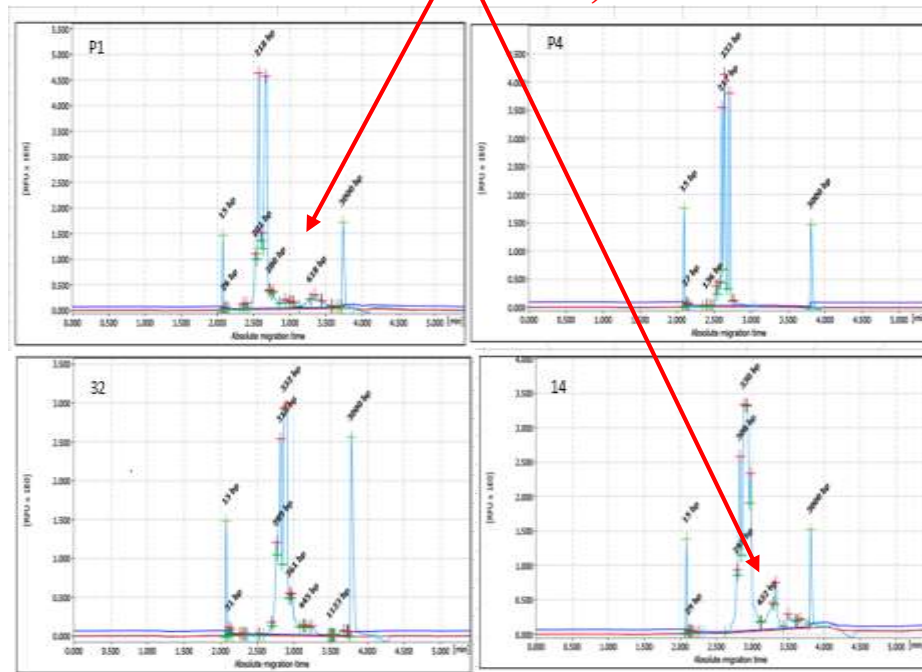
Output elettroforesi capillare



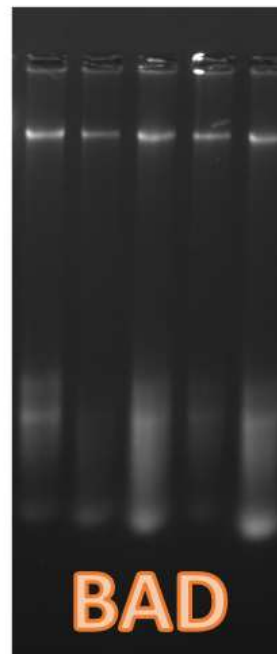
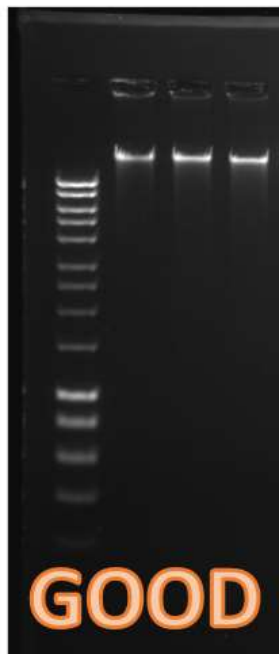
Verifica insert size (2)



Contaminazioni, cross-dimer??

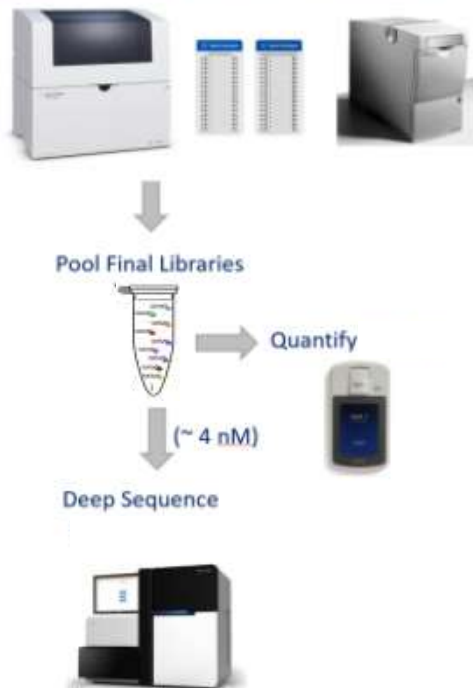


Controllare DNA genomico



Normalizzazione e pool delle libraries

QC & Quantify on TapeStation or Bioanalyzer



1. Verifica dell'insert size e quantificazione dei campioni - normalizzazione

$$\frac{(\text{concentration in ng/ul})}{(\text{660 g/mol} \times \text{average library size})} \times 10^6 = \text{concentration in nM}$$

↓
dsDNA bp

2. Pool libraries - Denaturazione con NaOH - Aggiunta controllo positivo Phix (n%)

3. Caricamento della library



