

Amplikonový modul – flexibilní doplněk k hybridizačním panelům

Hirschfeldová Kateřina, Obeidová Lena, Urbanová Markéta, Elišáková Veronika, Štekrová Jitka

Ústav biologie a lékařské genetiky, 1. Lékařská fakulta Univerzity Karlovy a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze

Úvod: Masivní paralelní sekvenování umožnilo efektivní diferenciální diagnostiku a pomohlo překlenout řadu limitací spojených se Sangerovým sekvenováním, nicméně přináší obtíže při sekvenaci vysoce homologických sekvencí, jako jsou oblasti pseudogenů nebo rozptýlené repetitivní sekvence, které obklopují nebo jsou součástí řady alternativně sestřižených exonů. Vhodným řešením je v těchto případech sekvenace dlouhých specifických produktů amplifikační reakce. Současně v laboratoři často vyvstává potřeba mít možnost osekvenovat ad hoc připravené produkty amplifikace i z dalších důvodů (segregace v rodině, konfirmace, detekce mozaiky, určení rozsahu krátké delece/duplikace), kdy Sangerova sekvenace nemusí být vždy řešením.

Cíle: Cílem naší práce bylo vytvořit modul, který by nám umožnil osekvenovat metodou masivního paralelního sekvenování pomocí krátkých čtení vlastní produkty amplifikační reakce různé délky na pozadí hybridizační knihovny.

Metodika: Metodická část zahrnovala testování různých způsobů a efektivitu fragmentace amplikonů o různé délce, způsobu jejich přípravy, míchání a ředění s hybridizační knihovnou, na jejímž pozadí budou amplikony sekvenovány. Rovněž byla testována „in-house“ bioinformatická analýza amplikonového modulu.

Výsledky: Vypracovali jsme postup pro přípravu přídatného modulu ze směsi vlastních amplikonů od 250 do 7000 bp určeného pro sekvenaci na pozadí hybridizačních panelů pomocí masivního paralelního sekvenování s krátkým čtením. Využití modulu bylo úspěšně testováno na platformě Illumina MiSeq i NextSeq, validováno a verifikováno. Parametry výsledného přídatného modulu a možnosti jeho využití jsou přijaty a budou publikovány v *The Journal of Molecular Diagnostics* (<https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2022.05.002>).

Závěr: Vytvořený přídatný amplikonový modul k hybridizačním panelům zvyšuje diagnostickou výtěžnost a umožňuje cílenou validní analýzu i vysoce homologických sekvencí.

Financováno z institucionálních fondů programu COOPERATIO pro výzkumné projekty „207036 Medical Diagnostics and Basic Medical Sciences“ a „207034 Internal Disciplines“.