

# Sequenz-Anreicherung mit Microtropfen-PCR für die gezielte Sequenzierung

Jeff Olson, RainDance Technologies, Inc., Lexington, USA

Seit der Einführung der Sanger-Sequenzierung in den siebziger Jahren hat die DNA-Sequenzierungstechnologie große Fortschritte erzielt. Das Rennen, die DNA-Sequenzierung ernsthaft zu verbessern, begann 1990 mit dem Start des Human Genome Projects. Jedes der Next-Generation-Sequencing-Verfahren, die nach Abschluss des Projektes im Jahr 2003 auf den Markt drängten, nahm für sich in Anspruch, vollständige Genome schneller, genauer und kostengünstiger zu sequenzieren. Obgleich die Fähigkeit, vollständige Erbgutsätze sequenzieren zu können, oft vorteilhaft ist, gibt es eine ganze Reihe von Anwendungen, die lediglich das Screenen ganz bestimmter genomischer Regionen erfordern, wie etwa Genotyp-Phänotyp-Analysen, die Suche nach chromosomalen Hot Spots und krankheitsrelevanten Genen sowie der Nachweis von SNPs oder seltenen Genvarianten. Trotz der verbesserten Effizienz der Next-Generation-Sequencing-Systeme bleibt die Sequenzierung tausender vollständiger Genome gegen verschiedenste Phänotypen ein wirtschaftlich völlig unrealistisches Unterfangen. Um das volle Potential der neuen Sequenzierungsverfahren ausschöpfen zu können, wird daher ein robustes Verfahren benötigt, mit dem relevante genomische Loci im Megabasen-Maßstab isoliert werden können. Methoden zur Sequenzanreicherung und Genom-Partitionierung, die vor dem Sequenzieren eingesetzt werden können, wurden bereits zur gezielten Abtrennung relevanter genomischer Regionen eingesetzt. Diese Sequenzanreicherungs-Plattformen müssen kosteneffektiv, gezielt und verlässlich spezifische genomische Regionen erkennen. Gelingt es effektiv, bestimmte Sequenzen anzureichern, können mehr Proben pro Zeiteinheit analysiert werden. Der dadurch bedingte höhere Durchsatz hilft, Arbeit, Zeit und Kosten einzusparen.

Da die PCR (Polymerase chain reaction) einen einfachen, flexiblen und robusten Arbeitsablauf sowie ein hohes Ausmaß an Empfindlichkeit und Spezifität bietet, wird die Amplifikation interessierender Genomregionen als Goldstandard bei der Sequenzanreicherung betrachtet. Der Hauptnachteil des Verfahrens zeigt sich jedoch bei der Skalierbarkeit. Sobald die Zielregionen größer werden, müssen mehr Amplicons eingesetzt werden, um diese abzudecken. Dies führt zu einem höheren Bedarf an Template-DNA und PCR-Reagenzien, also zu insgesamt höheren PCR-Kosten sowie potentiellen Zusatzkosten durch die Notwendigkeit, teure Automationslösungen zu implementieren. Je ausgedehnter also die Zielregion, desto unpraktischer erweist sich die PCR bei der Sequenzanreicherung.

## Eine neue Mikrotröpfchen-basierte Plattform zur Sequenzanreicherung

Raindance Technologies hat ein Verfahren entwickelt, das das Skalierbarkeitsproblem löst und die robuste und einfache PCR-Methode mit der Skalierbarkeit kleinvolumiger Mikrotröpfchen verbindet. Herzstück des Verfahrens, das u.a. die empfindliche Hochdurchsatz-Analyse individueller Genvariationen eröffnet, ist ein Mikrotröpfchen-basiertes System für den PCR-Schritt (Rainstorm™). Dabei werden mehr als eine Million Tröpfchen, in denen jeweils eine separate PCR-Reaktion abläuft, in ein einziges Röhrchen gegeben, ohne dabei ihre Integrität

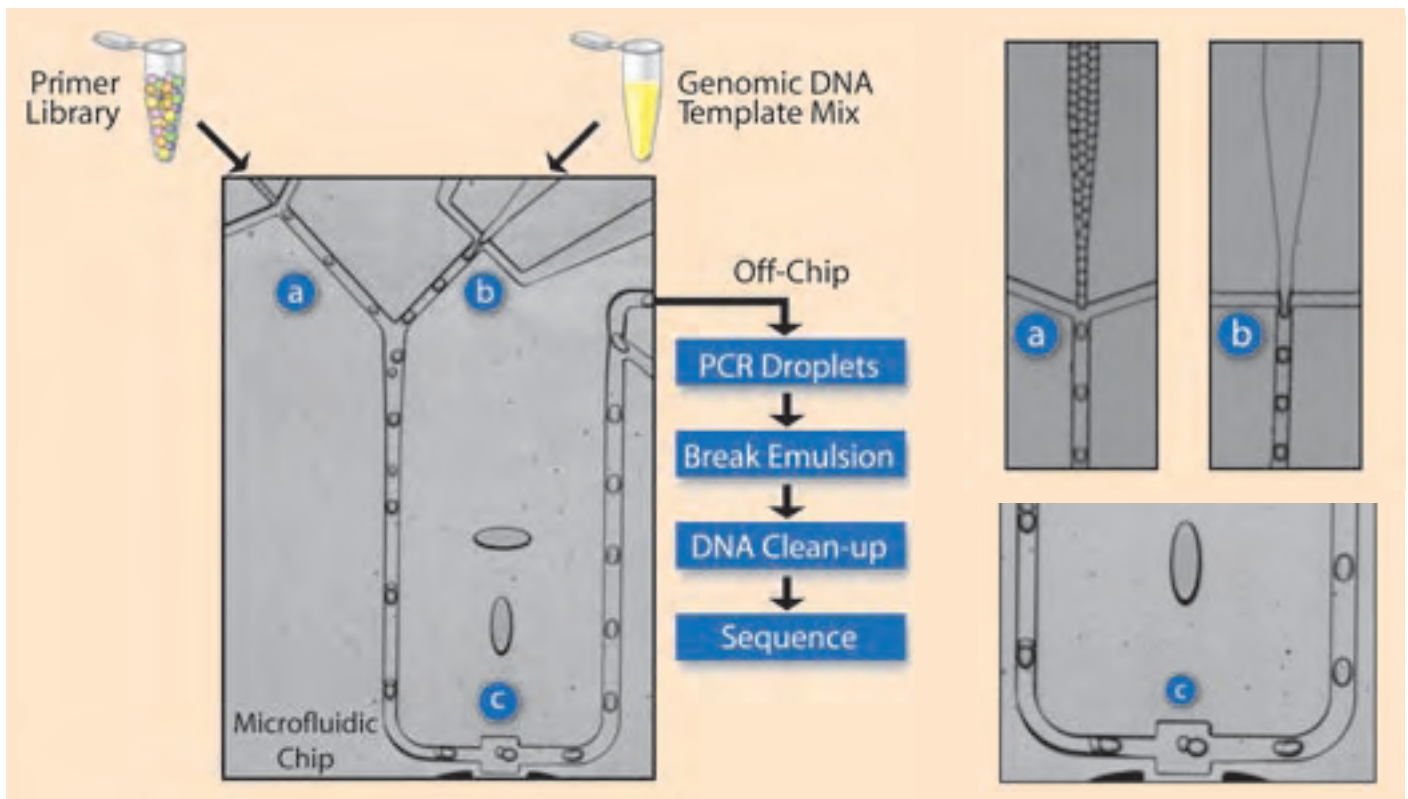
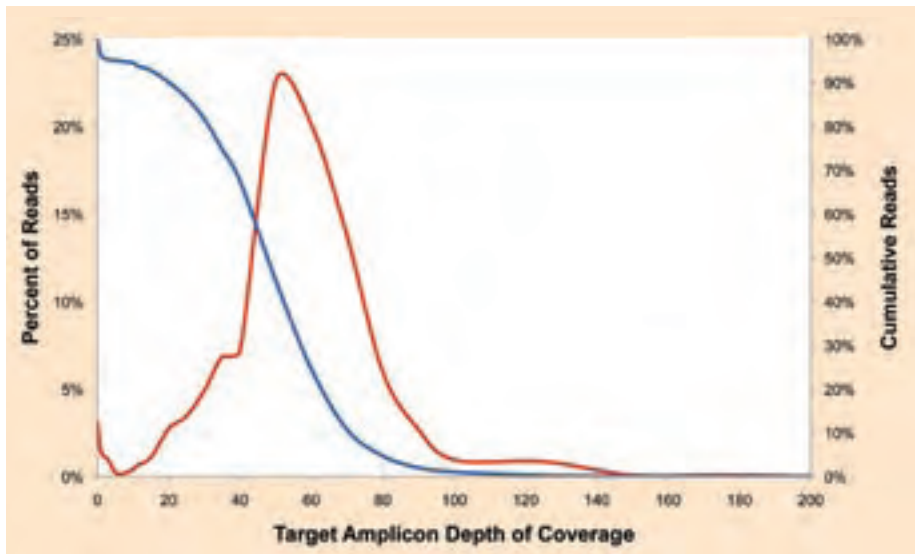


Abb. 1: Schema der Abläufe der Sequenzanreicherung auf einem Rainstorm™ Mikrofluidik-Chip. a. Injektion der Primer-Library-Tropfen. b. Herstellung der Templatetropfen auf dem Chip. c. Tropfenfusion in der Mischkammer. Details siehe Text



**Abb. 2:** Resultate der gezielten Sequenzierung (454 FLX Daten). Gezeigt ist die Verteilung der Amplicon-Readtiefe (rot) und der kumulativen Readtiefe (blau) aller 3976 PCR-Amplicon.

zu verlieren. Die Picoliter-Tröpfchen können dadurch in Standard-Thermocyclern prozessiert werden, denn ein proprietäres Netzmittel stabilisiert das wässrige Tröpfchen an der Grenzfläche zum umgebenden Ölfilm. Die stabile Trennung der Picoliter-großen Reaktionskompartimente ermöglicht ein Multiplexing in einem einzigen Röhrchen, das mehreren hundert bis tausend PCR-Reaktionen entspricht, zugleich aber die Kinetik und Robustheit einer Singleplex-Reaktion aufweist. Für die PCR werden zwei Sets von Tröpfchen präpariert, sogenannte Template-Tröpfchen sowie Primer-Library-Tröpfchen.

Die 25 µm im Durchmesser messenden, vollautomatisch hergestellten Primer-Library-Tröpfchen (Volumen 8 Picoliter) enthalten eine Bibliothek von bis zu 4.000 Primerpaaren, wobei jeder Tropfen ein anderes Primerpaar enthält. Das vollautomatische System, mit dem sich jeweils mehrere hundert bis tausend Tropfen eines jeden Primerpaares herstellen lassen, zählt beim Herstellungsprozess die Zahl der produzierten Tropfen jedes Primerpaares und überprüft deren Volumen. Dies stellt sicher, dass alle Primerpaare gleichstark in der Bibliothek repräsentiert sind, damit eine ausgeglichene Abbildung der interessierenden genomischen Bereiche und Ampliconausbeute erreicht wird. Die Primer-Library-Tröpfchen werden zentralisiert im Kundenauftrag hergestellt und an Endkunden versandt.

Die 33 µm im Durchmesser messenden Template-Tröpfchen (Volumen 18 pl), die im Labor des Endnutzers auf dem RDT 1000-Instrument hergestellt werden, enthalten genomische Template-DNA (2 µg Template-DNA reichen dabei für mehr als 10<sup>6</sup> Reaktionströpfchen aus), DNA-Polymerase, dNTPs und PCR-Puffer.

Primer-Library-Tröpfchen und Template-Tröpfchen werden unter Einsatz eines mikrofluidischen Einmalchips auf dem RDT 1000-Instrument zusammengeführt. Dazu wird die Primerpaar-Library in Port A des Chips geladen, während die

wässrige Template-Lösung auf Port B des Chips aufgetragen werden (vgl. Abb. 1).

Die Template-Tröpfchen werden erst auf dem Chip (an der Einspritzöffnung, vgl. Abb. 1, B) geformt, wandern den Kanal hinab und verbinden sich im Verhältnis ein Template-Tröpfchen zu ein Primerpaar-Tröpfchen mit der Primerpaar-Bibliothek. In der Mischkammer (Abb. 1C) induziert ein elektrisches Feld die Vermischung der bis dahin lediglich gepaarten Tröpfchen zu sogenannten PCR-Tröpfchen. Diese werden dann am Chipkanal-Ausgang (Abb. 1, Off-Chip) in Standard PCR-Röhrchen gesammelt und die darin enthaltene DNA anschließend in handelsüblichen Thermocyclern jeweils im Tropfen amplifiziert. Nach der PCR-Reaktion wird die DNA aus der Emulsion isoliert und kann anschließend auf Next-Generation-Sequenzier-Plattformen analysiert werden.

Um die Qualität der Sequenzanreicherung vor nachfolgenden Studien zu beurteilen, gibt es insbesondere zwei für Forscher wichtige Kriterien, die einen direkten Einfluss auf die Datenqualität und Kosten einer Studien haben können: Der Prozentsatz der repräsentierten Zielbasen bei minimaler Abdeckung (Redundanz) sowie der Sequenzierungsaufwand, um diese Abdeckung zu erreichen. Dabei interessiert es besonders, soviel Targetsequenz wie möglich mit ausreichender Abdeckung bei zugleich minimalem Sequenzierungsaufwand zu erhalten, um eine größere Probenanzahl untersuchen zu können und damit die Studie besser statistisch abzusichern.

### Fallstudie

Entsprechende Daten wurden in einem Experiment erhalten, in dem die Sequenzanreicherung auf der Plattform von Raindance Technologies mit einer Primer-Tropfen-Bibliothek durchgeführt wurde, die 3.976 Amplicons entsprechend

1,6 Mb genomischer Sequenz enthielt. Die nachfolgende Sequenzierung erfolgte auf zwei Kanälen eines Illumina GAI-Instrumentes. Bei 10 oder mehr Reads innerhalb eines Laufes konnten 99% der Zielbasen dektectiert werden, wobei 94% der Zielbasen sehr gleichmäßige Reads (0,2 des Mittelwertes) zeigten (vgl. Abb. 2). Die Vollständigkeit und Uniformität der Sequenzanreicherung ermöglicht die gezielte Sequenzierung auf Next-Generation-Sequenzier-Plattformen, zum Beispiel, um zuverlässig und mit minimalem Sequenzieraufwand Varianten zu detektieren. Als Teil des 9.972 Primer-Tropfen-Sequenzanreicherungsexperimentes wurde eine HapMap-Probe der Coriel-Probenbank (NA 18858) sequenzangereichert und nachfolgend auf zwei Kanälen des Illumina GAI-Systems sowie einer halben Picoliterplatte des Roche/454-GS-FLX-Systems analysiert. Bei der Analyse der Sequenzläufe hinsichtlich des Auftretens von SNPs zeigte sich eine Konkordanz von 99,8% zu Daten der HapMap-Datenbank. Eine zusätzliche Allelfrequenz von 49,5% für heterozygote SNPs dokumentiert die Leistungsfähigkeit und Arbeitsökonomie der hier vorgestellten Mikrotropfen-PCR bei der gezielten Anreicherung spezifischer genomischer Regionen.

### Ausblick

Die derzeitige Abkehr von häufig auftretenden Genvariationen bei der Suche nach krankheitsrelevanten Genvarianten zugunsten seltener auftretender Variationen, wird einen verstärkten Einsatz der Next-Generation-Sequenzierung begünstigen. Um die Signifikanz seltenerer Varianten statistisch belegen zu können, wird es erforderlich sein, größere Probenzahlen zu screenen. Neben der Optimierung der Next-Generation-Sequenzier-Verfahren wird deshalb die Arbeitsökonomie und Leistungscharakteristik von Sequenz-Anreicherungsverfahren für spezifische genomische Zielregionen immer bedeutender werden, da diese die Kosten pro Probe maßgeblich bestimmen.

Die von von Raindance Technologies entwickelte Mikrotropfen-PCR zur Sequenzanreicherung bietet in diesem Zusammenhang eine ganze Reihe von Vorzügen: die Flexibilität sowohl auf diskrete Loci als auch zusammenhängende Sequenzen abzuzeilen; die Möglichkeit die gezielte Sequenzierung in großen Kohorten anwenden zu können; signifikante Einsparungen an Studienzeit und -kosten sowie drastische Verkürzung der hands-on-Zeit durch einen vereinfachten Arbeitsablauf.

### Korrespondenzadresse

Jeff Olson  
RainDance Technologies, Inc.  
Lexington, Massachusetts USA  
olsonj@raindancetech.com  
www.raindancetech.com