

Ghid de proceduri de secvențiere targetată/adaptativă

În unele aplicații de secvențiere, obiectul studiului — o singură genă sau o selecție de regiuni genomice — reprezintă doar o mică fracțiune din genom sau din probă. În astfel de cazuri, secvențierea întregului genom poate fi ineficientă și costisitoare. Secvențierea țintită/adaptativă/targetată este un termen utilizat pentru a descrie strategiile care reduc timpul petrecut secvențind regiuni care nu prezintă interes, reducând semnificativ cantitatea de date necesară pentru a atinge adâncimea dorită în regiunile de interes. Acest lucru reduce costurile de secvențiere, volumul de analiză a datelor și permite un flux de lucru mai rapid. Secvențierea țintită utilizând tehnologia nanopore poate fi realizată în mai multe moduri:

- Secvențiere amplicon
- Pull-down
- Adaptive sampling

Secvențierea cu Oxford Nanopore permite decodificarea în timp real a regiunii genomului care este secvențiată. Această caracteristică permite luarea deciziilor în timp real despre faptul că o anumită secvență de ADN prezintă interes sau nu. Aceasta se numește adaptive sampling și poate efectua selecția în timp real a citirilor atunci când software-ul de secvențiere (MinKNOW) este furnizat cu un fișier .bed care conține regiunile de interes (ROI) și un fișier de referință FASTA.

Adaptive sampling oferă o metodă rapidă și flexibilă de a îmbogăți regiunile de interes prin respingerea regiunilor care nu sunt țintă: selecția țintelor are loc în timpul secvențierii propriu-zise, fără a necesita manipularea probei înainte de secvențiere. Pregătiți și încărcați biblioteca în mod normal și selectați „adaptive sampling” în MinKNOW (va fi necesar să încărcați un fișier FASTA cu secvența de referință, precum și un fișier .bed care detaliază regiunile de interes).

Odată ce secvențierea începe, datorită naturii în timp real a secvențierii nanopore, MinKNOW identifică dacă firul care este secvențiat se află în regiunea de interes (ROI). Dacă citirea nu se mapează la ROI, MinKNOW inversează polaritatea potențialului aplicat, eliminând firul din por pentru a permite acceptarea unui fir nou. Firele care nu sunt țintă sunt respinse în mod continuu până când un fir din ROI este detectat, iar secvențierea este permisă să continue.

Adaptive sampling poate funcționa în două moduri diferite: enrichment (îmbogățire) și depletion (depleție).

- În modul enrichment, încărcați regiunile de interes (ROI) în MinKNOW, care va respinge firele ce nu se încadrează în aceste regiuni.
- În modul depletion, încărcați țintele care nu prezintă interes (de exemplu, ADN-ul gazdă într-o analiză metagenomică gazdă : microbiom) în MinKNOW, care va respinge firele ce se încadrează în aceste regiuni.

Am observat o îmbogățire a regiunilor de interes de aproximativ 5-10 ori atunci când se utilizează adaptive sampling, iar mai jos sunt detaliate recomandările noastre pentru atingerea acestui nivel.

Atunci când vizați regiuni din genomuri umane, am constatat că acest nivel de îmbogățire este stabil dacă fracțiunea totală țintită este mai mică de 10% din genomul total. Acest lucru vă permite să obțineți o adâncime medie de >20-40x pentru regiunile de interes (ROI) pe o MinION Flow Cell.

Deși adaptive sampling nu necesită o pregătire specifică a probei, există câteva aspecte ale pregătirii bibliotecii care pot îmbunătăți performanța unui experiment de acest tip.

Sunt doi factori principali de luat în considerare pentru a maximiza rezultatele: ocuparea porilor și fragmentarea bibliotecii.

Ocuparea porilor

Metodologia adaptive sampling se bazează pe respingerea firelor de ADN nedorite pentru a elibera porul, pregătindu-l să captureze un nou fir. Acest proces poate cauza o reducere semnificativă a ocupării porilor, deoarece respingerea constantă a firelor reduce timpul în care porii sunt ocupați cu un fir.

Prin urmare, menținerea unei ocupări ridicate a porilor este unul dintre cele mai importante aspecte în adaptive sampling. Pentru a realiza acest lucru, recomandăm încărcarea unei cantități mai mari de probă decât cea utilizată în mod normal pentru o secvențiere standard. Cantitatea adecvată de ADN ce trebuie încărcată în flow cell trebuie calculată din punctul de vedere al molarității, și nu al masei.

Fragmentarea bibliotecii

Fragmentarea bibliotecii este importantă din două motive:

1. Lungimea fragmentelor influențează molaritatea, care este principalul parametru utilizat pentru a determina cantitatea de ADN ce trebuie încărcată într-o rulare adaptive sampling.
2. Rulările adaptive sampling au un risc mai mare de blocare a porilor din cauza cantității mari de fire respinse. Utilizarea unei biblioteci formate din fragmente mai scurte crește durata de viață a flow cell-ului și, implicit, cantitatea de date obținută, deoarece biblioteka provoacă mai puține blocaje și oferă o molaritate mai mare cu cantități mai mici de ADN total.

Nu doar că fragmentarea ADN reduce blocajele, dar poate și crește enrichmentul, în funcție de dimensiunea regiunilor de interes (ROI). De exemplu, dacă majoritatea regiunilor de interes au o lungime de câțiva kb (de exemplu, 2–5 kb), utilizarea unei biblioteci cu un N50 de 30 kb este inefficientă. Acest lucru se datorează faptului că, de fiecare dată când un fir este acceptat pentru secvențiere, porul va fi ocupat secvențind 30 kb de date pentru a extrage doar 2–5 kb de secvență țintă, ceea ce reprezintă o risipă de 23–25 kb. În acest timp, porul ar putea analiza mai multe citiri, în loc să secvențieze date care nu sunt țintă.

Metode pentru creșterea randamentului în adaptive sampling

O metodă suplimentară pentru a crește randamentul este efectuarea de spălări multiple ale flow cell-ului pe parcursul rulării și reîncărcarea bibliotecii. Totuși, reducând dimensiunea fragmentelor din bibliotecă, puteți reduce numărul de spălări necesare și maximiza cantitatea de date obținută dintr-un experiment de secvențiere.

Dimensiunea fragmentelor afectează molaritatea probei, mai ales dacă folosiți un Qubit sau alte metode bazate pe masă pentru a calcula cantitatea de ADN încărcată în flow cell. Qubit este metoda recomandată pentru evaluarea concentrației bibliotecii de ADN, dar aceasta trebuie convertită într-o concentrație molară, ceea ce se poate realiza pe baza lungimii medii a fragmentelor.

Lungimile fragmentelor pot fi evaluate folosind:

- Agilent Femto Pulse (pentru fragmente >10 kb)
- Agilent Bioanalyzer (pentru fragmente <10 kb).

Folosind greutatea moleculară medie a unei perechi de baze (660 g/mol), se poate calcula ușor molaritatea probei. Această conversie determină necesarul de masă al ADN pentru biblioteci scurte și lungi să fie diferit atunci când se normalizează la aceeași molaritate. Molaritatea este un factor critic, deoarece numărul de capete de ADN disponibile pentru captarea de către pori este principalul factor care îmbunătățește ocuparea porilor.

Considerații suplimentare:

1. Eficiența optimă a ligării:

Aceste calcule și valori presupun o eficiență optimă a procesului de ligare. Dacă, din orice motiv, bibliotecă nu se liguează eficient, este recomandat să adăugați o cantitate mai mare de probă în rularea de secvențiere.

2. Limitele de încărcare a ADN-ului:

Este important de menționat că un aport mai mare de ADN nu a demonstrat efecte negative asupra rulării atunci când se utilizează chimie V14, până la un maxim de 600 ng. Acest lucru oferă flexibilitate atunci când se lucrează cu biblioteci care pot avea o eficiență mai mică de ligare.