FAGLIG

Historisk tilbageblik og udvikling på Afdeling for Genomisk Medicin

Fra Denaturing High-performance Liquid Chromatography og Sanger-sekventering til genpaneler og helgenomsekventering.

AF:
MALENE NØRAGER

Bioanalytiker,
Afdeling for Genomisk Medicin, Rigshospitalet

MARTIN SKYGGE

Chefbioanalytiker,
Afdeling for Genomisk Medicin, Rigshospitalet

Afdeling for Genomisk Medicin har siden starten af årtusindet arbejdet med diagnostik inden for det molekylærgenetiske område. Afdelingens mission er at forbedre patientbehandlingen ved at levere ved at levere de bedste molekylærgenetiske analyser til forebyggelse, tidlig intervention, diagnose og behandling. Afdelingen i sin nuværende form blev etableret i 2011 og har siden udviklet og implementeret ny teknologi og dataanalysestruktur til gavn for de kliniske miljøer. Laboratoriet har gennemgået et væld af automatiseringer af udstyr og metoder lige siden. Dette ses i udviklingen inden for DNA/RNA-oprensning, analysemetoder, bioinformatiske pipelines og digitalisering af rekvirering og svarafgivelse til rekvirerende afdelinger.

DNA-oprensning

DNA-oprensning fra blod var i starten en manuel procedure, som blev automatiseret første gang i 2014. Indtil da blev det foretaget manuelt primært ved søjleoprensning. Den kontinuerlige stigning i prøveantal medførte et stort behov for at få oprensningen automatiseret, både for at kunne håndtere flere prøver og for at højne kvaliteten. Dengang var kriterierne for valg af oprensningsmetode et stort prøveantal samtidig med høj koncentration og rent DNA-udbytte. Protokol til blodoprensning tog fem timer og har været i brug indtil sidste år, dvs. en levetid på næsten 10 år. Med den robot var det muligt at oprense 64 prøver dagligt.

Turn-around-tiden er til stadighed en vigtig faktor sammen med de førnævnte kriterier. Inden for de sidste par år var afdelingen derfor nødsaget til at finde en oprensningsmetode, der kunne oprense flere prøver på kortere tid. Afdelingen er endt med tre oprensningsrobotter, hvor protokollen tager 1½ time, og som kan oprense op til 288 prøver om dagen samlet set, hvilket er en væsentlig kapacitetsøgning. Det nye setup medfører en høj grad af fleksibilitet i forhold til akutte prøver, og de kan fungere som backup for hinanden.

Analysemetoder

Tilbage i nullerne analyserede afdelingen BRCA1- og BRCA2-generne, fire gener relateret til tarmkræft og andre gener. Da det er enormt tidskrævende manuelt at Sanger-sekventere 50-60 exons pr. patient, blev prøverne forscreenet ved brug af Denaturing High-performance Liquid Chromatography (dHPLC). Her blev smeltekurven for hvert exon vurderet i forhold til en kontrolkurve, som bestod af en negativ kontrolprøve uden mutationer.

I de tilfælde hvor smeltekurven lignede kontrolkurven, blev exon anset som negativt. Lå smeltekurven derimod anderledes end kontrollen, blev exons analyseret ved Sanger-sekventering. Prøveopsætningen til Sanger-sekventering kunne hurtigt blive meget kompliceret, da forskellige exons fra hver patient blev analyseret med specifikke primere. Få patienter kunne derfor resultere i mange prøver, der hver skulle tilsættes forskellige reagenser og primere for de forskellige exons.

Der er dog nogle ulemper ved Sanger-sekventering, da den er meget ressourcekrævende og kræver meget laboratorietid i forhold til andre metoder. Risikoen for fejl er stor, når der skal tilsættes forskellige reagenser til forskellige brønde i en PCR-plade. Dette begrænser antallet af patienter pr. opsætning, hvilket ikke er attraktivt, hvis man opererer med korte svartider.

Svartiden på et enkelt gen kunne variere fra 4 til 12 måneder. På grund af både de præanalytiske og analysetekniske faktorer var der dengang flere prøver, der fejlede undervejs.

FIGUR 1

Specifikationer som sekventeringstid, data-output og antal reads for de forskellige sekventeringsinstrumenter med udgangspunkt i sekventering med 2 x 150 bp. (3) (4) (5) (6).

MiSeq

Flowcelle	2 x 150 bp v3
Mid-Output	2 x 150 bp S4
Sekventeringstid	~ 24 timer
Dataoutput	5,1 Gb
Antal reads	44-50 millioner

NextSeq 550

Flowcelle	2 x 150 bp
Mid-Output	2 x 150 bp 25B
Sekventeringstid	~ 26 timer
Dataoutput	39 Gb
Antal reads	Op til 260 millioner

NovaSeq 6000

Sekventeringstid	~ 44 timer
Dataoutput	3.000 Gb
Antal reads	20 milliarder

NovaSeq X Plus

Sekventeringstid	~ 48 timer
Dataoutput	~ 8.000 Gb
Antal reads	52 milliarder

Derfor skulle prøverne analyseres igen, hvilket resulterede i lange svartider og større setup. Problemer med kvaliteten ses ikke i dag, da de er elimineret ved metodeudviklingen. Sanger-sekventering anvendes dog stadig i nogle af de tilfælde, hvor mutationen, der ønskes undersøgt, er kendt (1).

Det var en naturlig del af udviklingen at anvende en platform til analyserne, hvor flere specifikke gener blev sekventeret samtidigt i et genpanel. Dette er muligt ved anvendelse af Next Generation Sequencing (NGS). På den måde kunne hele genet, og i nogle tilfælde flere gener, analyseres ved samme DNA-forberedelse. Der var dog stadig tilfælde, hvor samme patient skulle have analyseret gener fra forskellige genpaneler.

Der blev i 2012 udformet et genpanel med fem forskellige brystkræftrelaterede gener, som blev sekventeret på MiSeq fra Illumina. Det var muligt at sekventere op til 24 prøver på én MiSeq-kørsel. Med tiden blev der tilføjet flere gener og genpaneler, bl.a. med tarmkræftrelaterede gener. Tilføjelse af gener og genpaneler resulterede i, at afdelingen i 2019 havde mere end 140 forskellige gener fordelt på syv genpaneler. Genpanelanalysen tog 7 dage med DNA-forberedelse og sekventering.

I forbindelse med stigning i antallet af prøver blev der i 2020 udarbejdet et nyt samlet genpanel med 58 af de mest attraktive gener. Det nye genpanel har resulteret i flere unikke adapters, hvilket giver mulighed for at sekventere flere prøver sammen. Yderligere kan alle prøver gennemgå den samme DNA-forberedelse, og dermed skal hver prøve kun analyseres én gang. Det nye genpanel sekventeres på NextSeq 550 fra Illumina, hvor der kan sekventeres 96 prøver ad gangen. Flowet tager fem dage inkl. sekventering, hvilket muliggør en svartid på omkring fire uger.

Foruden genpanelerne begyndte Afdeling for Genomisk Medicin i 2018 at udføre helgenomsekventering. Det muliggør, at de få prøver, der skal analyseres for gener, der ikke længere er i genpanelerne, kan analyseres ved helgenomsekventering. Prisen for en helgenomsekventering var dengang omkring 15.000 kr., udelukkende for sekventering, hvilket i dag er faldet til omkring en tredjedel (2).

I 2019 indgik Afdeling for Genomisk Medicin et samarbejde med Nationalt Genom Center, hvilket indebar sekventering af 30.000 helgenomer inden sommeren 2024. For at imødekomme dette behov var det nødvendigt at optimere protokollen og gøre den skalerbar. Derfor blev den manuelle DNA-forberedelse erstattet med en automatiseret protokol. Ydermere var det nødvendigt at anskaffe flere sekventeringsinstrumenter. Afdeling for Genomisk Medicin har i dag 3 MiSeq, 2 NextSeq 550, 4 NovaSeq 6000 og 1 NovaSeq X Plus.

På de to forskellige NovaSeq-platforme er det muligt at sekventere to flowceller på hvert instrument ad gangen. På NovaSeq 6000 kan der sekventeres 19 helgenomer, mens der på NovaSeq X Plus kan sekventeres 38 helgenomer på hver flowcelle. Til sammenligning vil der i teorien kunne sekventeres mere end 8.000 genpaneler på samme størrelse flowcelle som 19 helgenomer (3) (4).

Den store mængde data, der kommer ud ved helgenomsekventering, gør, at databehandlingen af og svarafgivelsen ved hver prøve tager længere tid. Selve laboratoriedelen kan dog udføres på tre dage inkl. sekventering. Figur 1 viser sekventeringstid og datamængden for de forskellige sekventeringsinstrumenter.

Kvalitet

Kvalitetsudvikling er vigtig for afdelingen, hvilket resulterede i, at afdelingen blev akkrediteret i 2011. Det er derfor vigtigt hele tiden at vurdere afvigere og ændre procedurerne for at sikre den højeste kvalitet. Som en del af det øgede fokus på kvalitet er flere af procedurerne i DNA-forberedelse til sekventering overflyttet til robotter. Dette giver en markant større sikkerhed i forhold til prøveombytning og en mere ensartet kvalitet af DNA-forberedelsen.

Afdelingens analysekoder er sat op således, at der modtages to blodprøver på hver patient, prøve A og B. Prøve A anvendes til analyse og ved fund af mutationer ved genpanelanalysen, og prøve B blev tidligere analyseret ved Sanger-sekventering. På den måde blev fundet verificeret ved afdelingens tidligere standard, samtidig med at det sikredes, at der ikke var byttet rundt på prøver. Senere blev fund af mutationer verificeret ved at analysere prøve B ved samme analyse, udelukkende for at tjekke at der ikke var sket prøveombytning.

I 2019 implementerede afdelingen et Single-nukleotid ID assay. Her sekventeres få områder af DNA fra prøve B, som efterfølgende matches med samme områder fra prøve A. På den måde sikres det, at både prøve A og B stammer fra samme patient, og at der ikke er sket en prøveombytning ved prøvetagningen eller i analysearbejdet. Denne kontrolanalyse blev i starten kun anvendt ved helgenomsekventering, men anvendes i dag også ved genpanelerne. ◻

KILDER

1. Østergaard, Elsebeth et. al. Diagnostisk exomsekventering til udredning af syndromer. Ugeskrift for læger. 179, 2017.
2. Personlig Medicin og Individualiseret Behandling, Oplæg til en samlet dansk indsats. www.regioner.dk. [Online] Juni 22, 2015. [Cited: Jan 04, 2024.] Direkte link: rb.gy/f2qi9p
3. Specifications for the NextSeq 550 System, High-accuracy sequencing performance, with tunable read length, and multiple output configurations. Illumina. www.illumina.com. [Online] [Cited: Jan 04, 2024.] Direkte link: rb.gy/v9e3h6
4. Powerful performance, See output, run time, read length, sample throughput, and other key specifications for the NovaSeq 6000 system. Illumina. www.Illumina.com. [Online] [Cited: Jan 04, 2024.] Direkte link: rb.gy/87pz2j
5. Specifications for the MiSeq System, MiSeq offers short sequencing run times and long read lengths while maintaining high data quality. Illumina. www.illumina.com. [Online] [Cited: Jan 04, 2024.] Direkte link: rb.gy/npkf8u
6. Specifications, A new standard for high-throughput sequencing, Next-level sequencing output, sample throughput, and specifications for the NovaSeq X and NovaSeq X Plus Systems. Illumina. www.illumina.com. [Online] [Cited: Jan 04, 2024.] Direkte link: rb.gy/igs8es