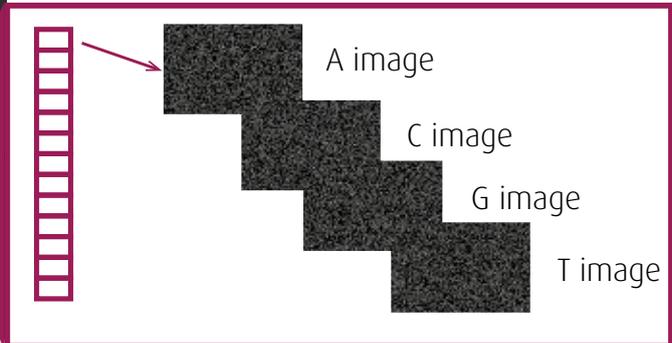




Abb. 2: Detektion einzelner Nucleotide während der Sequenzierreaktion: Im linken Teil der Abbildung ist die Fließzelle (Fa. Illumina®) dargestellt, auf der die SBS-Sequenzierreaktion stattfindet. Beim Einbau der passenden komplementären Nucleotide des zum kovalent an die Fließzelle gebundenen Fragmentes erfolgt gleichzeitig die photographische Detektion der Basenreihenfolge (SBS-Technologie). Ein heller Punkt auf dem für die jeweiligen Nucleotide separat aufgenommenen Bildern entspricht einem Cluster mit einem Durchmesser von ca. 1–3µm auf der Fließzelle.



Bildquelle: © 2016 Illumina, Inc; modifiziert

DNA-Fragmente der gleichen Sequenz. Nachdem die Cluster aus ausreichend vielen DNA-Fragmenten bestehen, erfolgt die eigentliche Sequenzierung.

Bei der Sequenzierung werden zeitgleich alle vier, an jeweils unterschiedliche Fluoreszenz-Farbstoff gekoppelte, Nucleotide über die Glasplatte gespült und somit der Polymerase zur Strangsynthese angeboten. In jedem Sequenzierzyklus wird genau ein Nucleotid komplementär zu der Template-DNA eingebaut. Nach Einbau einer passenden komplementären Base werden die Farbstoffe für jedes Nucleotid photographisch detektiert. Es wird also während des Einbaus ein Bild für jedes einzelne Nucleotid generiert – daher der Begriff „Sequencing By Synthesis“ (siehe Abb. 2: Detektion einzelner Nucleotide während der Sequenzierreaktion). Die übrigen nicht eingebauten Nucleotide werden durch darauffolgende Waschschriffe entfernt.

Derzeit kommen mehrere Sequenzierinstrumente in der molekulargenetischen NGS-basierten Diagnostik zur Anwendung, bei denen die oben beschriebene SBS-Methode zur Sequenzanalyse genutzt wird. In unserem Labor erfolgen die NGS-Analysen auf einem MiSeq der Firma Illumina®. Die Durchsatzrate dieses Gerätes liegt je nach verwendetem Reagenzienkit und Probenanzahl bei etwa 4 bis 15 Gigabasen (das entspricht einem Output von 4–15 x 10⁹ einzelnen Basen). Während einer Sequenzierreaktion im Gerät können bis zu 50 Millionen einzelne Cluster analysiert werden.

Nach der Sequenzierung der krankheitsrelevanten Genpanel erfolgt eine umfassende bioinformatische Aus-

wertung der erhaltenen großen Menge an Sequenz-Daten sowie die Erstellung eines humangenetischen Gutachtens.

Benötigtes Material

Für die NGS-basierte molekulargenetische Analyse benötigen wir ein kleines EDTA-Röhrchen (2,7 ml), einen Laborüberweisungsschein mit Angabe der zu untersuchenden Gene und die Einwilligungserklärung gemäß GenDG des Patienten.

Analysedauer

Die Bearbeitungszeit des Untersuchungsauftrages beträgt i.d.R. vier bis sechs Wochen.

Wir freuen uns auf Ihre Einsendung.

Ihr Team der Molekulargenetik.

Ihre Ansprechpartner:
Dr. rer. nat. Barbara Thamm
Fachhumangenetikerin GfH
 E-Mail: b.thamm@labor-leipzig.de
 Telefon: +49 341 6565-791

M.Sc. Jana Meyer
Leitung NGS
Abteilung Humangenetik
 E-Mail: j.meyer@labor-leipzig.de
 Telefon: +49 341 6565-792