



Next Generation Sequencing (NGS)

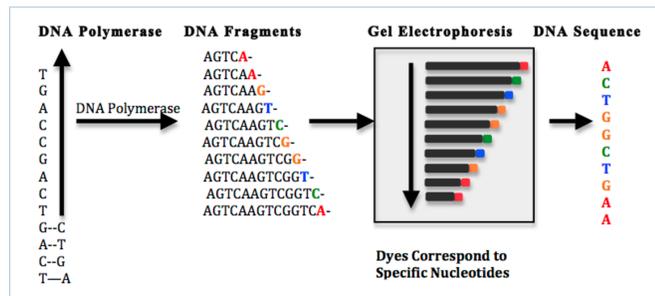


Abb. Didesoxymethode nach Sanger (1st Generation)

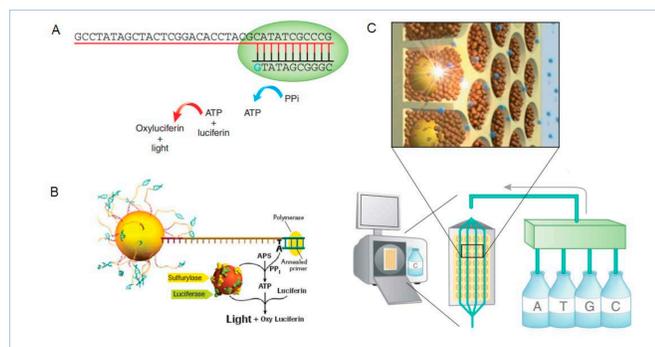


Abb. Pyrosequencing, GS-FLX System (Roche), 454 Life Sciences (2nd Generation)

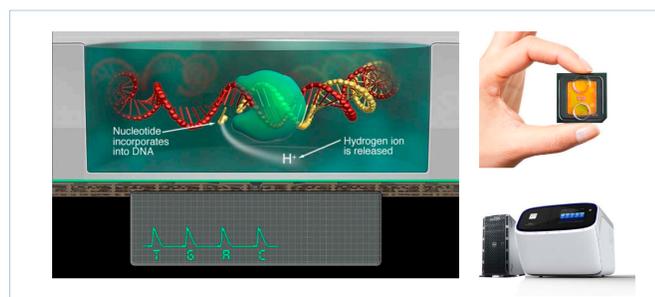


Abb. Halbleitersequenzierung, Ion PII Chip, Ion Proton, Thermo Fisher Scientific

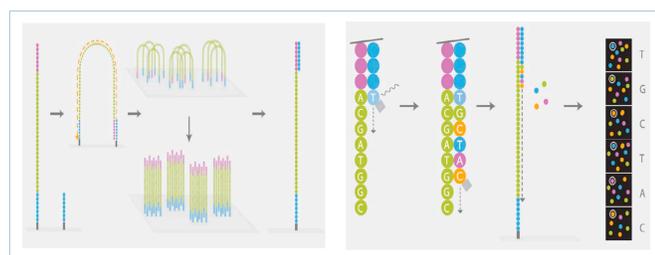


Abb. Klonale Amplifikation, CRT-Technologie, Solexa / Illumina (2007)

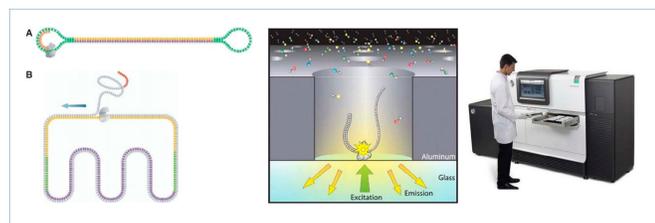


Abb. SMRTbell, ZMW, PacBio RSII, Pacific Biosciences (3rd Generation)



Abb. ONT Sequencing, MinION, PromethION, Voltrax (4th Generation)

Was ist NGS?

Als «Next Generation Sequencing (NGS)» werden DNA-Sequenziermethoden der dritten (3rd) Generation bezeichnet. Allgemein werden mittels Sequenzierung die Nukleotidabfolge von DNA bestimmt und somit auch Mikroorganismen detektiert. Bereits 1977 wurde die «Didesoxy- oder Kettenabbruchmethode nach Sanger» beschrieben, welche die erste Sequenzierung des Bakteriophagen φX174 ermöglichte (Nobelpreis der Chemie 1980). Das humane Genom mit 3.2 Milliarden Basen wurde erstmals in über 13 Jahren von 1990 bis 2003 für 3 Milliarden US-Dollar entziffert.

2nd Generation Sequencing

In 2001 wurde die (454-) Pyrosequenzierung beschrieben, welche das Sequenzieren des humanen Genoms in 8 Tagen ermöglichte. Dabei werden DNA-Stücke (1 kB) über Adaptersequenzen an Beads gekoppelt und mittels Emulsions-emPCR auf den Beads vervielfältigt. Diese werden zusammen mit Polymerasen auf einen mit Bead-grossen Poren versehenen Chip verteilt. Der Chip wird sequenziell mit den vier Nukleotidtypen geflutet und bei Einbau einer Base wird über ein Enzymsystem Chemilumineszenz erzeugt und pro Pore erfasst. Bei der optimierten Halbleitersequenzierung (Ion Torrent, 2011) wird dieselbe Probenvorbereitung angewendet. Der Einbau eines Nukleotides wird aber anhand des pH-Unterschiedes gemessen, welcher durch das freigegebene H-Atom entsteht.

In 2005 wurde die klonale Amplifikation von Adapter-gebundenen DNA-Fragmenten auf einem Chip beschrieben (Solid-phase amplification). Für die Sequenzierung werden Farbstoff- und Terminatorgruppe-gekoppelte Nukleotide verwendet, welche bei Einbau über einen Laser angeregt und deren Fluoreszenz fotografiert wird. Farbstoff und Terminatorgruppe, welche die Strangverlängerung verhindert, werden abgespalten und die Synthese beginnt von neuem (Cyclic Reversible Termination (CRT)).

3rd Generation Sequencing

Bei Methoden der dritten Generation können erstmals einzelne DNA-Moleküle analysiert werden. Die bisher erfolgreichste Methode wurde 2012 von der Firma Pacific Biosciences vorgestellt. Dabei wird an DNA-Fragmenten (8 kB) beidseitig eine Haarnadelstruktur und einseitig ein Primer und eine Polymerase angehängt. Diese SMRTbells werden innerhalb eines SMRT-Chips auf den Boden eines der 150 000 Löcher (ZMW: Zero-mode Waveguides) verteilt. Der SMRT-Chip wird mit allen vier individuell markierten Nukleotiden geflutet und die Signalabgabe beim Einbau einer Base durch die Polymerase wird nach Anregung durch den ZMW-Boden gemessen (6 TB (Tera) Daten in 30 min).

4th Generation Sequencing

Bei der Nanoporen-Sequenzierung (2015) wird die Nukleotid-spezifische Potentialänderung an einer künstlich erzeugten Membran gemessen, welche beim Durchfluss von DNA-Molekülen durch eingebettete Nanoporen hervorgerufen wird. Dazu wird an DNA-Fragmenten (8 kB) eine Haarnadelstruktur (3') und eine Polymerase (5') angehängt. Als Nanoporen werden bakterielle Transmembranproteine als auch synthetische Poren (Siliciumnitrid, Graphen) verwendet. Als mobile Variante wird von der Firma Oxford Nanopore Technologies (ONT) der USB-stick grosse MinION zusammen mit der Probenvorbereitungseinheit Voltrax zur Verfügung stehen. Für höhere Probendurchsätze ist der grössere PromethION gedacht.

