

Příloha č. 1

Princip NGS

Metoda**vyšetření:****Next Gen Sequencing (NGS)****Použité kity:**

BRONCO (SureSelectXT HS2, Agilent)

NextSeq 550 Mid Output Kit v2 (150 cycles) (Illumina)

Princip metody:

K vytvoření sekvenační knihovny je použita technologie SureSelect XT HS2 target enrichment (cílené obohacení). Vzorek DNA o vstupním množství 10-200 ng je nejprve fragmentován na fragmenty 150-200 bp. Ty jsou v dalším kroku označeny tzv. molekulárními barkódami, které umožňují rozlišení jednotlivých fragmentů a odfiltrování artefaktů vzniklých během následující amplifikace. Po amplifikaci jsou výsledné PCR produkty hybridizovány se sondami, které byly pro vybrané geny speciálně navrženy. Úseky DNA, které nebyly nahybridizovány k sondám jsou potom odseparovány pomocí magnetických kuliček. Výsledná „capture sekvenační knihovna“ je znovu amplifikována, jednotlivé vzorky jsou dále poolovány v ekvimolárním poměru a sekvenační run probíhá na přístroji Illumina NextSeq dle instrukcí výrobce. Sekvence probíhá pomocí syntézy komplementárního řetězce, kde je v každém cyklu inkorporován a zaznamenán jeden odlišně značený nukleotid. Čtení je prováděno z obou stran amplifikovaných fragmentů a přiřazeno k referenční sekvenci. Nakonec jsou vyhodnoceny nalezené varianty.

Limitace metody:

NextGen sekvenování není doporučeno pro mapování vysoce repetitivních sekvencí. Tato metoda není optimalizována pro detekci inzercí, delecí a translokací. S použitým pokrytím je metoda vhodná pouze pro detekci germinálních variant.

Sledované parametry sekvenačního běhu:

- skóre kvality Q30 musí být víc jak 80 %
- počet čtení na vzorek musí být větší než 3 miliony
- podíl cílených bází (ROI) s pokrytím nižším než 50x musí být pod 2 %.
- medián pokrytí ROI musí být větší než 300x
- podíl duplikovaných čtení musí být menší než 50 %