

Your solution provider
in the world of genomics

SERVIZI NGS NEXT GENERATION SEQUENCING



Personal Genomics



SERVIZI NGS

NEXT GENERATION SEQUENCING

DNA SEQUENCING

PREPARAZIONE DEL CAMPIONE	4
ESTRAZIONE	4
CONTROLLO QUALITÀ	4
SEQUENZIAMENTO	4
ESOMA (WES) E PANNELLI	5
MIGLIORARE LA GENOTIPIZZABILITÀ	6
PANEL DESIGN	7
CNV SU PANNELLI	8
GENOMA COMPLETO (WGS)	8
ANALISI BIOINFORMATICA	9
ALLINEAMENTO E CHIAMATA DELLE VARIANTI	9
ANALISI DI COPERTURA E GENOTIPIZZABILITÀ	9
ANNOTAZIONE	10
PRIORITIZZAZIONE	11

RNA SEQUENCING

PREPARAZIONE DEL CAMPIONE	12
ESTRAZIONE	12
CONTROLLO QUALITÀ	12
SEQUENZIAMENTO	12
Analisi Bioinformatica	13
ANALISI DI ESPRESSIONE DIFFERENZIALE STANDARD	13
ESEMPI DI ANALISI CUSTOM	13

METAGENOMICS

PREPARAZIONE DEL CAMPIONE	14
ESTRAZIONE	14
CONTROLLO QUALITÀ	14
SEQUENZIAMENTO DI AMPLICONI (16S O ITS)	14
ANALISI BIOINFORMATICA	14
ESEMPIO DI CLASSIFICAZIONE TASSONOMICA	15
SEQUENZIAMENTO SHOTGUN DELLA COMUNITÀ MICROBICA	16
ANALISI BIOINFORMATICA	16
SEQUENZIAMENTO E ASSEMBLAGGIO DEL GENOMA MICROBICO	17
ANALISI BIOINFORMATICA	17

SERVIZI NGS

DNA SEQUENCING

PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

ESTRAZIONE

Estrazione dalle diverse matrici (es. sangue, plasma, paraffinati, tessuto fresco e saliva) con kit ottimizzati per l'analisi NGS richiesta.

CONTROLLO QUALITÀ

Personal Genomics utilizza i principali strumenti di verifica della qualità e quantità del DNA estratto (NanoDrop, LabChip, Qubit). Per i campioni paraffinati, vengono valutati l'amplificabilità ed il grado di frammentazione del DNA.

SEQUENZIAMENTO

Il tipo di sequenziamento dipende dalla lunghezza della libreria e dalla scelta del kit di cattura. Personal Genomics utilizza sequenziatori Illumina, ma a richiesta è in grado di sequenziare anche su altre piattaforme (MinION, PacBio, BGI).

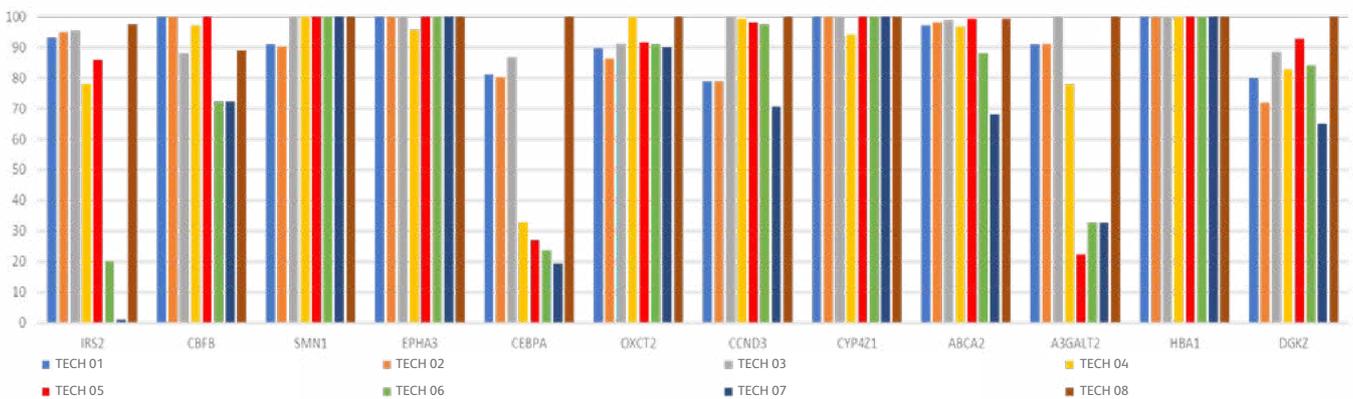
ESOMA (WES) E PANNELLI

Scelta del kit di cattura

Personal Genomics valuta costantemente le prestazioni delle nuove piattaforme di arricchimento. Questo permette di avere una banca dati proprietaria che può essere interrogata per valutare quale sia il kit più adatto per ogni regione dell'esoma.

Nella figura successiva viene riportato un esempio di sequenziamento WES con le informazioni relative alla percentuale di basi coperte da almeno 20 reads in 12 geni (in silico panel) analizzati con 8 diversi kit di arricchimento.

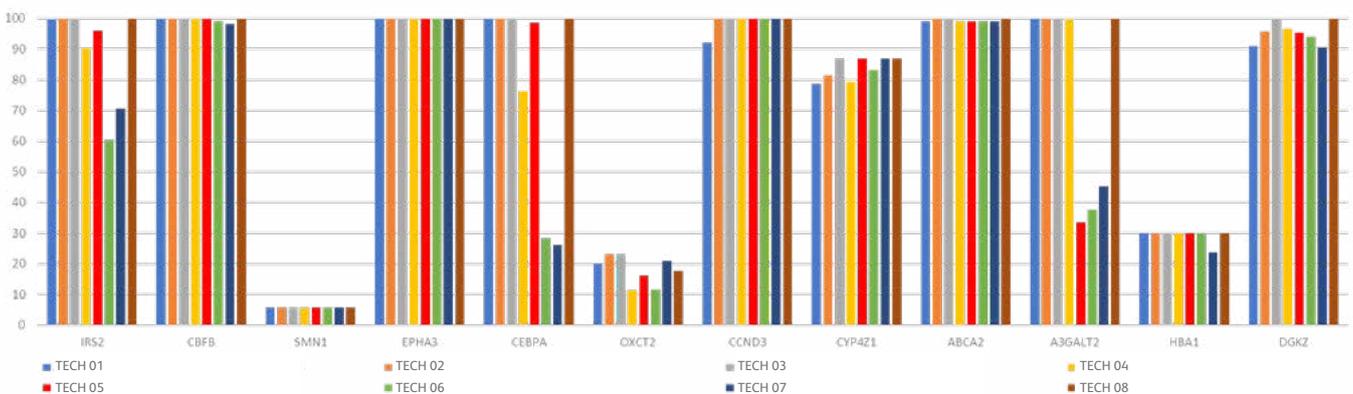
20X



I livelli nella percentuale di basi coperte variano a seconda del kit di cattura, tuttavia una buona copertura non significa sempre buona genotipizzabilità della regione target, in quanto tale parametro dipende dalla qualità dell'allineamento. Alcuni geni sono coperti molto bene con tutti i kit utilizzati,

ma non è comunque possibile chiamare le varianti a causa della bassa qualità di mappaggio. Infatti, la figura successiva evidenzia le differenze percentuali di basi genotipizzabili negli stessi geni e per gli stessi kit di cattura.

PASS



Per questi motivi, Personal Genomics ritiene che la copertura non sia un parametro di qualità sufficiente, dato che non garantisce una diretta correlazione con la genotipizzabilità.

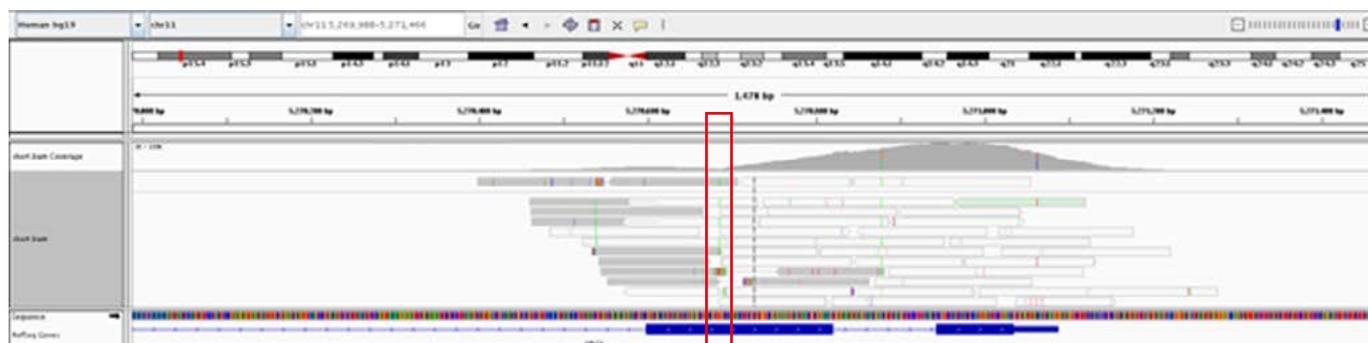
SERVIZI NGS DNA SEQUENCING

MIGLIORARE LA GENOTIPIZZABILITÀ

In alcune regioni del genoma (vedi figura sottostante) non è possibile chiamare una variante in una regione a bassa mappabilità, nonostante la copertura sia buona.

PROTOCOLLO STANDARD (2x75bp)

Insert size: 207 bp



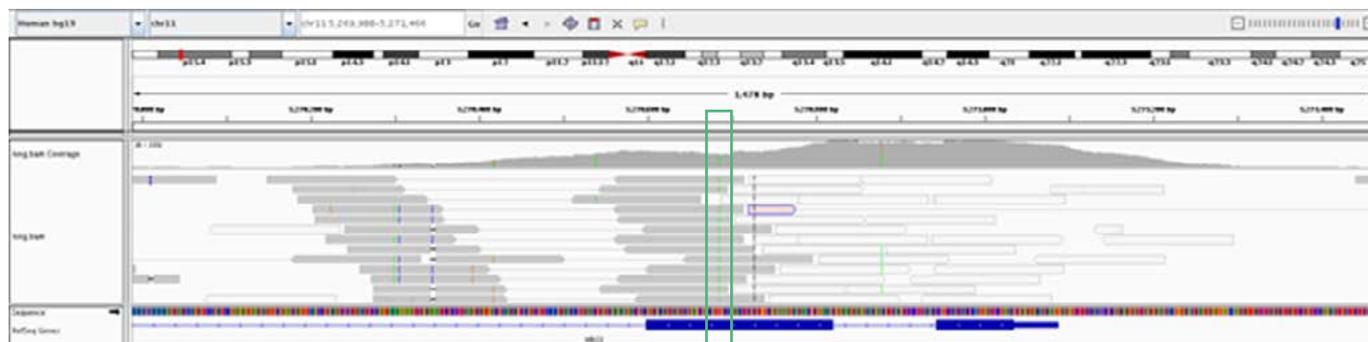
NOT PASS

Per ottenere la massima genotipizzabilità, Personal Genomics ha sviluppato protocolli di preparazione delle librerie di cattura in grado di modificare la lunghezza dei frammenti. Allungando il frammento ad una lunghezza media di circa 300-350bp contro le 150-200bp previste dai protocolli standard, è possibile sequenziare con protocollo 150PE e, di conseguenza, migliorare

la mappabilità delle sequenze e la successiva chiamata delle varianti. Infatti, la variante dell'esempio precedente che non era genotipizzabile con la libreria standard, viene chiamata correttamente utilizzando il protocollo di Personal Genomics (vedi figura sottostante).

PROTOCOLLO PERSONAL GENOMICS (2x150bp)

Insert size: 347 bp



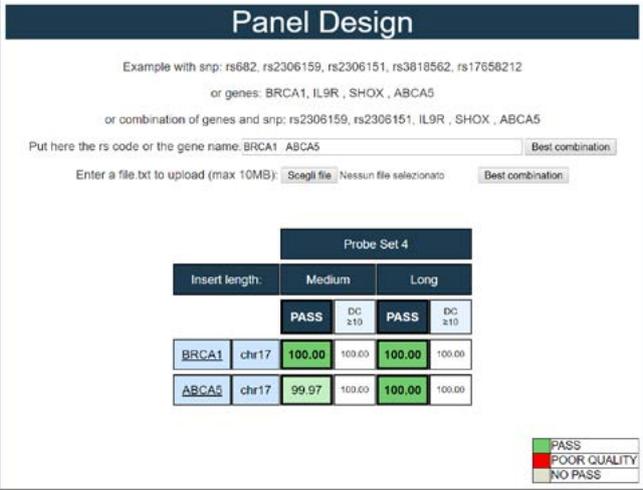
PASS
Variante chiamata

PANEL DESIGN

Le informazioni di copertura e genotizzabilità dei diversi kit di cattura al variare della lunghezza media del frammento hanno permesso lo sviluppo di un'applicazione che permette di scegliere la migliore configurazione possibile nel

sequenziamento di un pool di geni.

Personal Genomics ha brevettato il proprio metodo di produzione delle librerie.



Panel Design

Example with snp: rs682, rs2306159, rs2306151, rs3818562, rs17658212
or genes: BRCA1, IL9R, SHOX, ABCA5
or combination of genes and snp: rs2306159, rs2306151, IL9R, SHOX, ABCA5

Put here the rs code or the gene name: BRCA1 ABCA5

Enter a file.txt to upload (max 10MB): Nessun file selezionato

		Probe Set 4			
Insert length:		Medium		Long	
		PASS	DC >10	PASS	DC >10
BRCA1	chr17	100.00	100.00	100.00	100.00
ABCA5	chr17	99.97	100.00	100.00	100.00

Legend:
PASS (Green)
POOR QUALITY (Red)
NO PASS (Grey)

Programma Software

Personal Genomics ha realizzato un Software che permette di individuare la combinazione ottimale tra le varie tecnologie di sequenziamento a disposizione, kit di cattura e lunghezza dei frammenti.

Utilizzando il software PG Panel Design è possibile identificare la metodologia migliore per soddisfare le esigenze del cliente.

L'unità di ricerca e sviluppo di Personal Genomics aggiornano di continuo il software PG Panel Design arricchendo il database con i nuovi kit di cattura disponibili sul mercato.

Tali informazioni risultano di fondamentale importanza nello sviluppo di pannelli per diagnostica.

Referenze

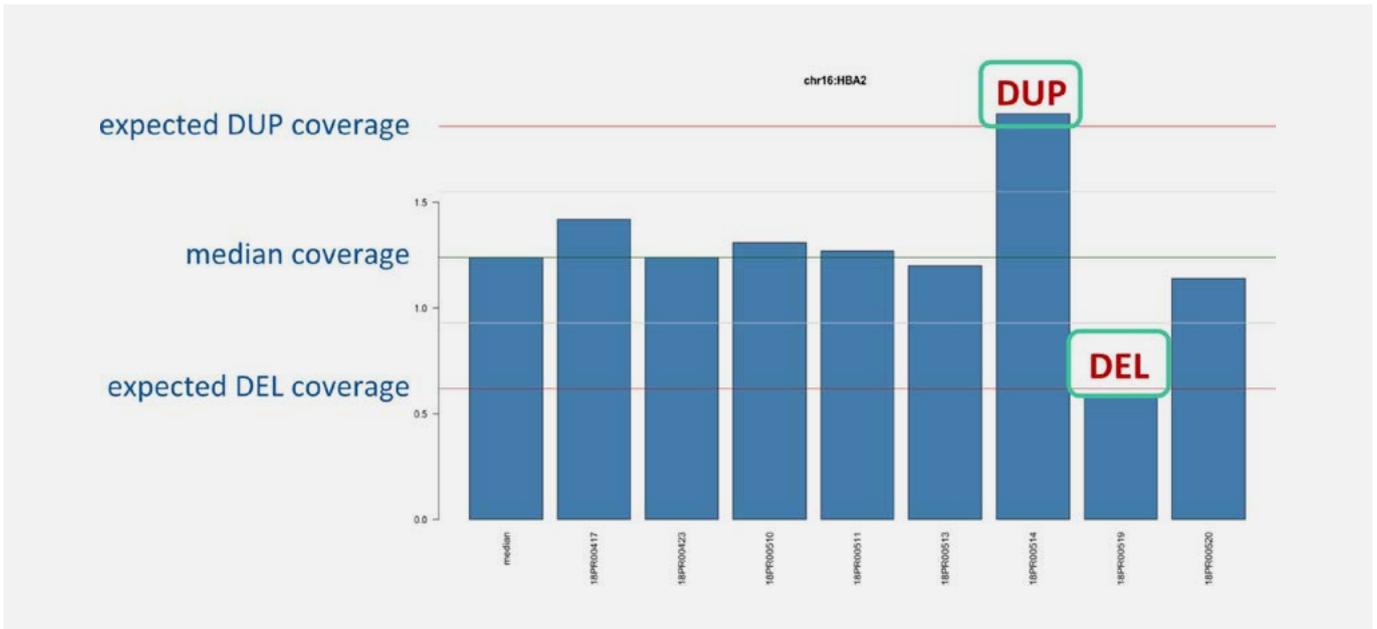
- EP3524695 (A1) - METHOD FOR THE PRODUCTION OF KITS FOR THE ENRICHMENT OF GENOMIC REGIONS.
- Barbara Iadarola, Luciano Xumerle, Denise Lavezzari, Marta Paterno, Luca Marcolungo, Cristina Beltrami, Elisabetta Fortunati, Massimo Delledonne. Enhanced targeted resequencing by optimizing the combination of enrichment technology and DNA fragment length. 2019, bioRxiv, DOI: 10.1101/712125.

SERVIZI NGS DNA SEQUENCING

CNV SU PANNELLI

Personal Genomics ha sviluppato pannelli che permettono la chiamata delle CNV sulle regioni target utilizzando il dosaggio quantitativo del DNA genomico mediante l'utilizzo di sonde molecolari.

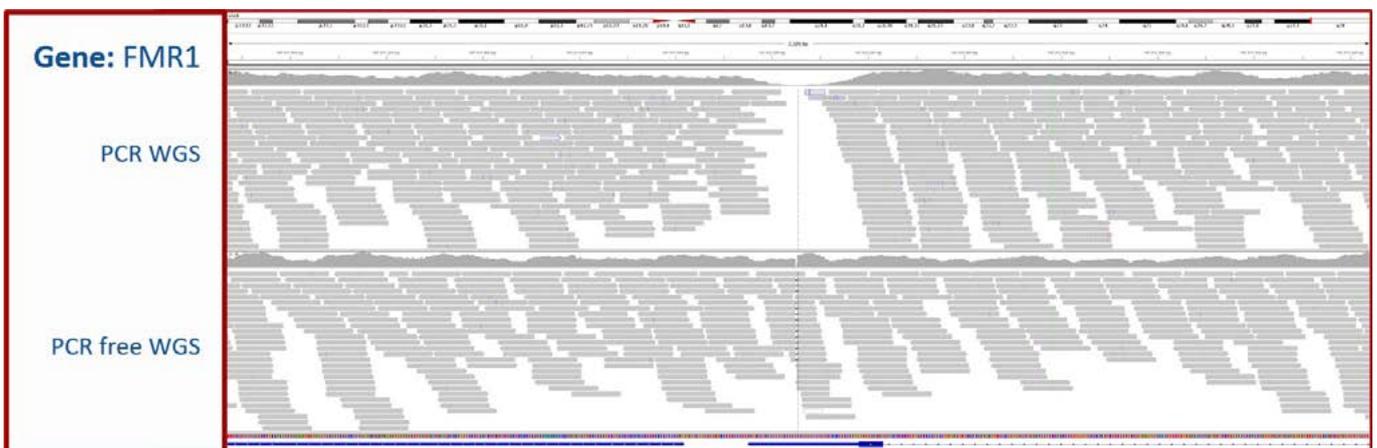
In figura sono riportati i risultati ottenuti sul gene HBA2 di 8 individui. La duplicazione e la delezione osservate sono state validate con un kit MLPA.



GENOMA COMPLETO (WGS)

Personal Genomics utilizza librerie PCR-free per garantire la massima copertura possibile. Librerie genomiche prodotte con protocolli che prevedono l'utilizzo della PCR mostrano una

copertura più irregolare o assente. Un esempio di tali limiti sono le regioni ricche in GC come ad esempio la CGG-repeat del gene FMR1:



Tramite il sequenziamento dell'intero genoma è possibile investigare diversi tipi di varianti:

- SNVs e indels
- Varianti Strutturali (es. CNV, inversioni, traslocazioni)
- Espansioni di triplette (es. FMR1, HTT)

ANALISI BIOINFORMATICA

	Analisi Bioinformatica di I livello	Analisi Bioinformatica di II livello	Analisi Bioinformatica di III livello
Demultiplexing			
Produzione dei file FastQ			
Allineamento			
Chiamata delle varianti			
Annotazione			
Priorizzazione delle varianti			

ALLINEAMENTO E CHIAMATA DELLE VARIANTI

- Allineamento su reference (hg19 o hg38) e produzione file BAM;
- Chiamata varianti con pipeline BWA-mem/GATK4 e produzione dei file VCF + regioni genotipizzabili.

Il VCF riporta le informazioni sulle varianti chiamate in un individuo ed assume che la mancanza di informazione equivalga alla presenza in omozigosi dell'allele di riferimento.

Tale assunto è falso perché una posizione potrebbe non essere presente nel VCF per mancanza di adeguata copertura nel pannello o per bassa mappabilità. Per questo Personal Genomics fornisce un file che riporta le regioni genotipizzabili. In alternativa alla pipeline standard BWA-mem/GATK4 è possibile produrre un file gVCF utilizzando la pipeline iSAAC-align/strelka.

ANALISI DI COPERTURA E GENOTIPIZZABILITÀ

Personal Genomics NON considera le coperture teoriche ma quelle reali, escludendo quindi:

- Off target
- Padded Region
- Duplicati

Ha sviluppato una pipeline per fornire una dettagliata analisi del coverage e della genotipizzabilità per tutte le regioni codificanti in RefSeq nel caso di un esoma completo o della regione target nel caso di un pannello.

CHROM	gene/region	gene/region length	avg_cov	%1X	%5X	%10X	%20X	%30X	%PASS	%PASS DP10
all	all	33642212	84.46	99.88	99.81	99.78	99.68	99.16	97	96.98
chr1	A3GALT2	1023	86.56	100	100	100	100	100	100	100
chr1	AADACL3	1057	95.63	100	100	100	100	100	100	100
chr1	AADACL4	1224	97.74	100	100	100	100	100	100	100
chr1	ABCA4	6822	70.89	100	100	100	100	100	100	100
chr1	ABCB10	2217	76.48	100	100	100	100	100	100	100
chr1	ABCD3	2007	63.68	100	100	100	100	100	100	100
chr1	ABL2	3702	98.19	100	100	100	100	100	100	100
chr1	ACADM	1377	72.38	100	100	100	100	100	100	100
chr1	ACAP3	2505	72.64	100	100	100	100	98.12	100	100
...
chr1	A3GALT2::33306765	688	93.39	100	100	100	100	100	100	100
chr1	A3GALT2::33312051	138	79.22	100	100	100	100	100	100	100
chr1	A3GALT2::33312500	90	68.11	100	100	100	100	100	100	100
chr1	A3GALT2::33312806	84	71.56	100	100	100	100	100	100	100
chr1	A3GALT2::33321075	23	53.57	100	100	100	100	100	100	100
chr1	AADACL3::12716340	4	68.5	100	100	100	100	100	100	100
chr1	AADACL3::12719477	214	80.39	100	100	100	100	100	100	100
chr1	AADACL3::12720882	64	51.48	100	100	100	100	100	100	100
chr1	AADACL3::12725221	775	103.62	100	100	100	100	100	100	100
chr1	AADACL4::12644546	168	82.2	100	100	100	100	100	100	100

La tabella riporta il nome del cromosoma; il nome del gene o della regione; la lunghezza della regione; la copertura media

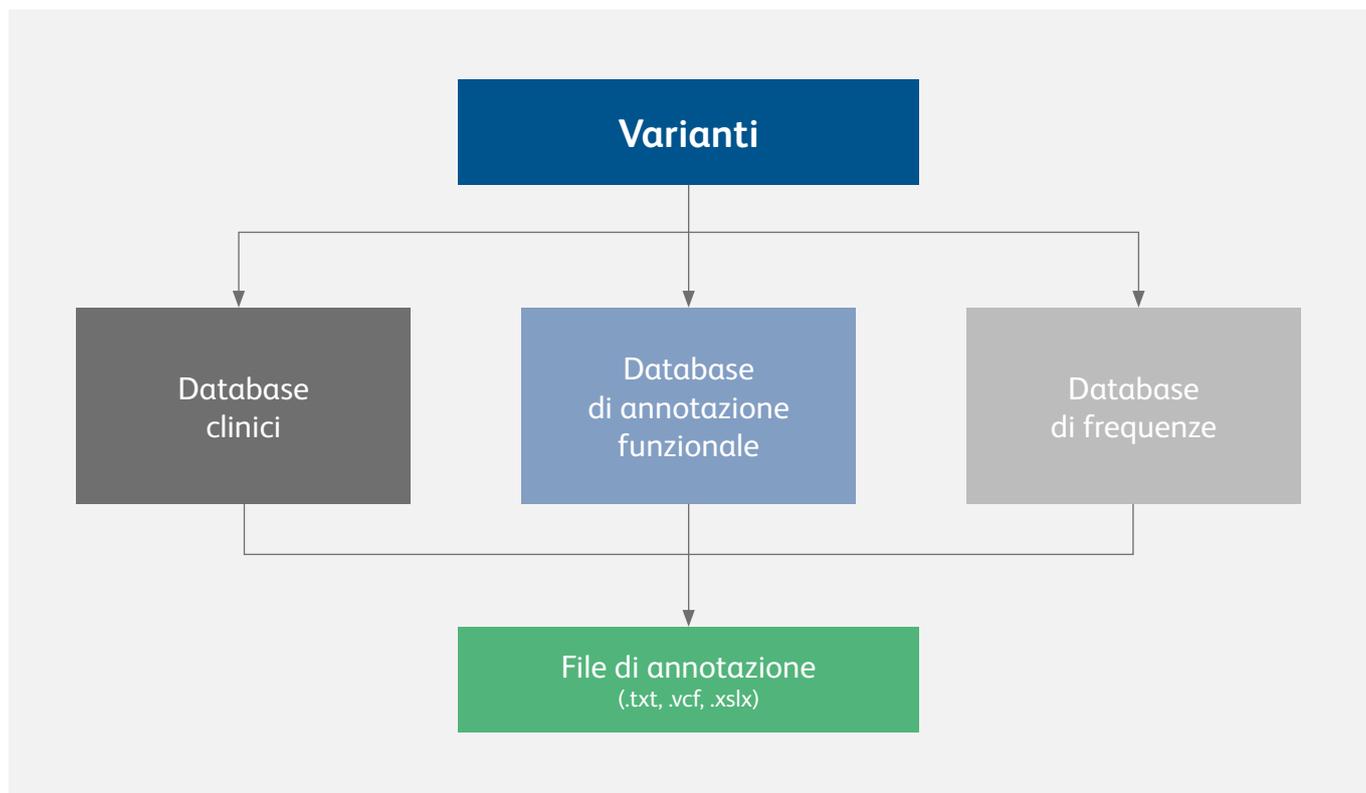
dopo filtraggio e rimozione dei duplicati; la percentuale di basi coperte; la percentuale di basi genotipizzabili.

SERVIZI NGS

DNA SEQUENCING

ANNOTAZIONE

Le varianti identificate vengono annotate con l'effetto predetto sulla proteina e con i dati presenti nei database pubblici.



Annotazione con database pubblici

- Clinici (OMIM, ClinVar, MedGen, CIViC, ICGC Simple Somatic Mutations);
- Frequenza nella popolazione (1000 Genomes project, NHLBI ESP6500, ExAC, gnomAD, PGVD);
- Annotazione funzionale (RefSeq, GWAS catalog, GTEx, ACMG IF, ExAC LoF, dbNFSP, ENCODE)

Annotazione con database commerciali

- HGMD Professional: contiene più di 250.000 varianti note causative di specifici fenotipi. Il database è curato manualmente da esperti genetisti, ed è costantemente aggiornato attraverso lo studio della letteratura. Personal Genomics utilizza la versione di HGMD Professional in locale, e questo permette di annotare le varianti prima dell'inizio del processo di prioritizzazione.

PRIORITIZZAZIONE

Analisi bioinformatica individuo

Le varianti annotate vengono prioritizzate, ovvero filtrate secondo specifici parametri e riportate come:

- Clinicamente significative (come riportate dai database clinici di ClinVar e/o HGMD);
- Varianti non riportate nei database clinici ma con conseguenze funzionali predette clinicamente significative;
- Frequenza nella popolazione;
- Frequenza nel database di Personal Genomics PGVD, che raccoglie ulteriori informazioni cliniche e fenotipiche sulle varianti, comprese quelle rare nella popolazione.

Analisi bioinformatica trio / familiare

Le varianti annotate vengono prioritizzate, ovvero filtrate secondo specifici parametri e riportate come:

- Clinicamente significative (come riportate dai database clinici di ClinVar e/o HGMD);
- Varianti non riportate nei database clinici ma con conseguenze funzionali predette clinicamente significative;
- Frequenza nella popolazione;
- Frequenza nel database di Personal Genomics PGVD, che raccoglie ulteriori informazioni cliniche e fenotipiche sulle varianti, comprese quelle rare nella popolazione;
- Ricostruzione della segregazione delle varianti nella famiglia (varianti de-novo, eterozigoti composti, omozigoti recessive).

Analisi bioinformatica per i tumori

Personal Genomics offre il servizio di prioritizzazione delle varianti per tessuti tumorali identificando:

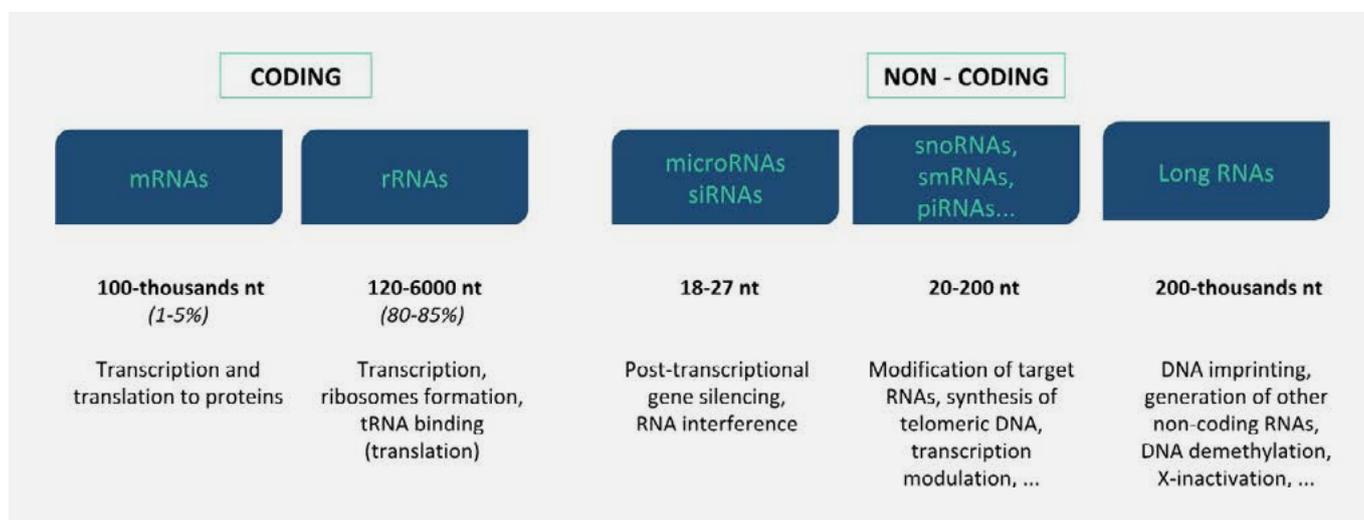
- Varianti somatiche patogenetiche o potenzialmente tali nei database clinici oncologici;
- Frequenza della variante somatica nel tessuto tumorale;
- Varianti non riportate nei database clinici ma con conseguenze funzionali predette clinicamente significative.

SERVIZI NGS

RNA SEQUENCING

Personal Genomics utilizza protocolli di Next Generation Sequencing che permettono l'analisi dell'RNA totale (WTS), ma

anche l'analisi specifica di RNA codificanti (RNA-seq) oppure microRNA (miRNA-seq).



PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

ESTRAZIONE

Estrazione dalle diverse matrici (es. sangue, plasma, paraffinati, tessuto fresco e saliva) con kit ottimizzati per l'analisi NGS richiesta.

CONTROLLO QUALITÀ

Personal Genomics utilizza i principali strumenti di verifica della qualità e quantità del DNA estratto (NanoDrop, LabChip, Qubit).

SEQUENZIAMENTO

Il protocollo di preparazione libreria ed il tipo di sequenziamento dipendono strettamente dallo scopo dell'indagine.

	RNA-seq	WTS	miRNA-seq
Tipo di RNA isolati	Per lo più codificanti (con coda poly-A)	Codificanti e non codificanti	microRNA
Metodo di selezione	Selezione dei poly-A	Deplezione rRNA	Selezione di miRNA maturi (3' OH, 5' P)
Libreria di sequenziamento	75SE / 75PE / 150PE	75SE / 75PE / 150PE	75SE

ANALISI BIOINFORMATICA *

	Analisi Bioinformatica di I livello	Analisi Bioinformatica di II livello	Analisi Bioinformatica di III livello
Demultiplexing			
Produzione dei file FastQ			
Allineamento su reference			
Analisi di espressione dei geni noti			
Analisi di espressione delle isoforme			

* Personal Genomics, su richiesta, è in grado di sviluppare anche pipeline custom che possono includere analisi differenti e/o aggiuntive rispetto a quelle in tabella.

ANALISI DI ESPRESSIONE DIFFERENZIALE STANDARD



ESEMPI DI ANALISI CUSTOM

- Chiamata varianti (germinali/somatiche);
- Analisi T-cell receptor / B-cell receptor;
- Tipizzazione HLA;
- Analisi scRNA-seq.

SERVIZI NGS METAGENOMICS

Personal Genomics utilizza protocolli di Next Generation Sequencing che permettono l'analisi delle comunità microbiche sequenziando un gene a scelta (Sequenziamento

di ampliconi 16S o ITS), oppure l'intero genoma o trascrittoma (Sequenziamento dell'intero genoma microbico oppure Sequenziamento shotgun della comunità microbica).

PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

ESTRAZIONE

Estrazione del DNA da diversi campioni biologici con kit ottimizzati per l'analisi NGS richiesta.

CONTROLLO QUALITÀ

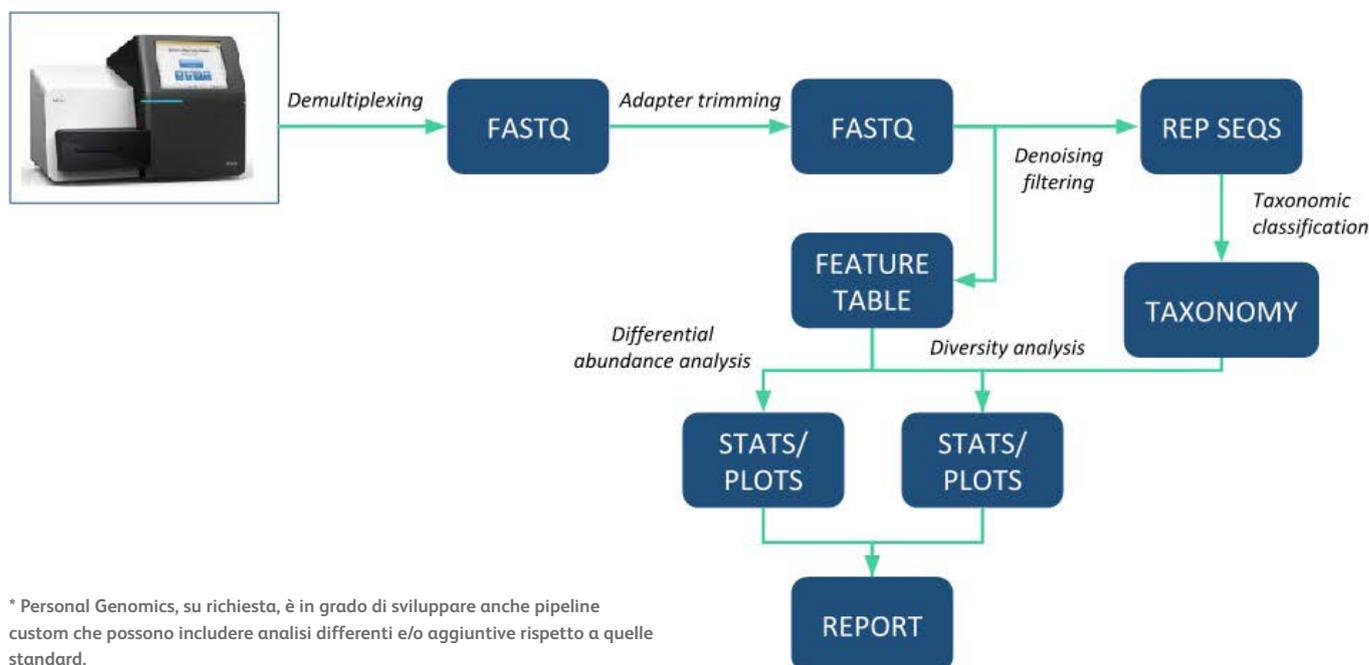
Personal Genomics utilizza i principali strumenti di verifica della qualità e quantità del DNA estratto (NanoDrop, LabChip, Qubit).

SEQUENZIAMENTO DI AMPLICONI (16S o ITS)

Il sequenziamento del 16S rRNA e dell'Internal Transcribed Spacer (ITS) sono le principali applicazioni dello sequenziamento di ampliconi in metagenomica.

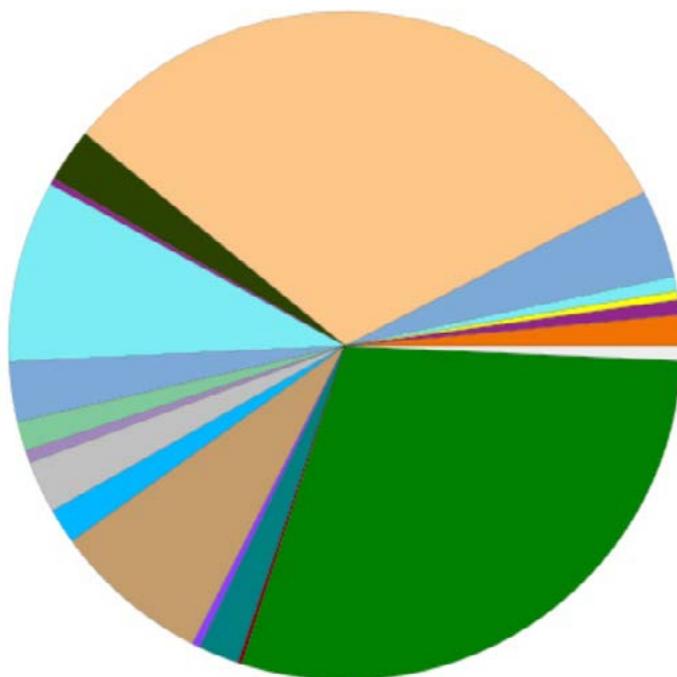
Questo tipo di sequenziamento permette di identificare e comparare le specie batteriche o fungine presenti in un campione.

ANALISI BIOINFORMATICA *



* Personal Genomics, su richiesta, è in grado di sviluppare anche pipeline custom che possono includere analisi differenti e/o aggiuntive rispetto a quelle standard.

ESEMPIO DI CLASSIFICAZIONE TASSONOMICA



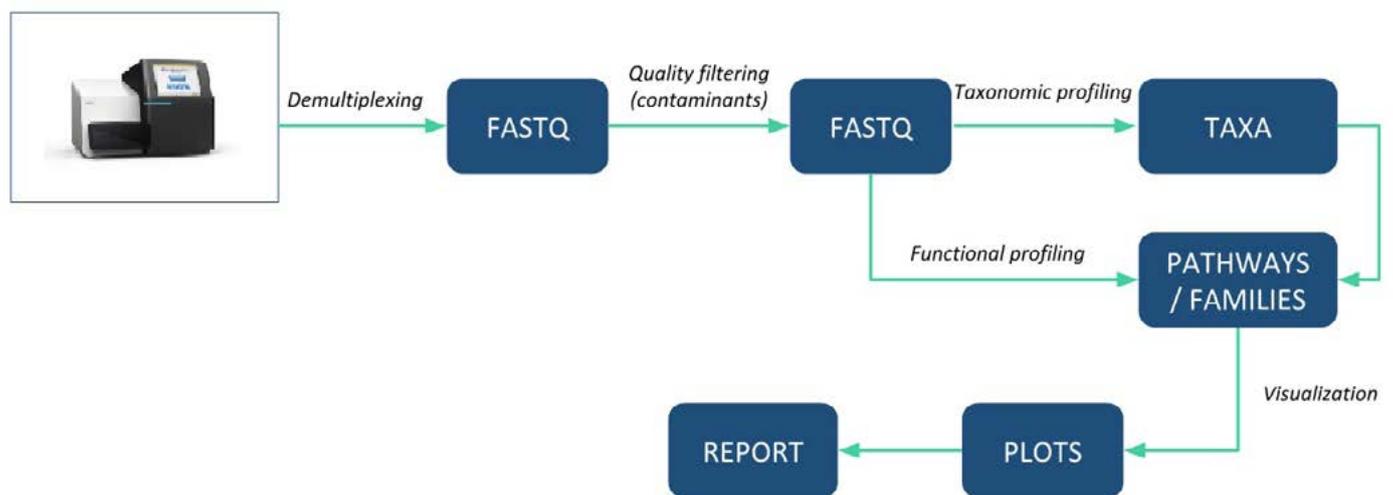
- k_Fungi;p_Ascomycota;c_Dothideomycetes;o_Capnodiales;f_Cladosporiaceae;g_Cladosporium;s_Cladosporium_sp
- k_Fungi;p_Ascomycota;c_Dothideomycetes;o_Dothideales;f_Aureobasidiaceae;g_Aureobasidium;s_Aureobasidium_pullulans
- k_Fungi;p_Ascomycota;c_Dothideomycetes;o_Pleosporales;f_Didymellaceae;g_Leptosphaerulina;s_Leptosphaerulina_sp
- k_Fungi;p_Ascomycota;c_Dothideomycetes;o_Pleosporales;f_Didymosphaeriaceae;g_Pseudopithomyces;s_Pseudopithomyces_chartarum
- k_Fungi;p_Ascomycota;c_Eurotiomycetes;o_Chaetothyriales;f_Herpotrichiellaceae;g_Exophiala;s_Exophiala_sp
- k_Fungi;p_Ascomycota;c_Eurotiomycetes;o_Eurotiales;f_Aspergillaceae;g_Aspergillus;s_Aspergillus_flavus
- k_Fungi;p_Ascomycota;c_Pezizomycetes;o_Pezizales;f_Sarcosomataceae;g_unidentified;s_Sarcosomataceae_sp
- k_Fungi;p_Ascomycota;c_Saccharomycetes;o_Saccharomycetales;f_Saccharomycetaceae;g_Issatchenkia;s_Issatchenkia_orientalis
- k_Fungi;p_Ascomycota;c_Saccharomycetes;o_Saccharomycetales;f_Saccharomycetaceae;g_Kluyveromyces;s_Kluyveromyces_sp
- k_Fungi;p_Ascomycota;c_Sordariomycetes;o_Hypocreales;f_Nectriaceae;g_Fusarium;s_Fusarium_sporotrichioides
- k_Fungi;p_Ascomycota;c_Sordariomycetes;o_Hypocreales;f_unidentified;g_unidentified;s_Hypocreales_sp
- k_Fungi;p_Ascomycota;c_Sordariomycetes;o_Xylariales;f_unidentified;g_unidentified;s_Xylariales_sp
- k_Fungi;p_Basidiomycota;c_Agaricomycetes;o_Russulales;f_Peniophoraceae;g_unidentified;s_Peniophoraceae_sp
- k_Fungi;p_Basidiomycota;c_Malasseziomycetes;o_Malasseziales;f_Malasseziaceae;g_Malassezia;s_Malassezia_restricta
- k_Fungi;p_Basidiomycota;c_Malasseziomycetes;o_Malasseziales;f_Malasseziaceae;g_Malassezia;s_Malassezia_sp
- k_Fungi;p_Basidiomycota;c_Microbotryomycetes;o_Sporidiobolales;f_Sporidiobolaceae;g_Rhodospordiobolus;s_Rhodospordiobolus_sp
- k_Fungi;p_Basidiomycota;c_Microbotryomycetes;o_Sporidiobolales;f_Sporidiobolaceae;g_Rhodotorula;s_Rhodotorula_sp
- k_Fungi;p_Basidiomycota;c_Microbotryomycetes;o_Sporidiobolales;f_Sporidiobolaceae;g_Sporobolomyces;s_Sporobolomyces_sp
- k_Fungi;p_unidentified;c_unidentified;o_unidentified;f_unidentified;g_unidentified;s_Fungi_sp

SEQUENZIAMENTO SHOTGUN DELLA COMUNITÀ MICROBICA

Il sequenziamento shotgun della comunità microbica permette di analizzare l'intero genoma o trascrittoma dell'intera comunità

di microrganismi (metagenoma/metatrascrittoma) contenuta in un campione.

ANALISI BIOINFORMATICA *

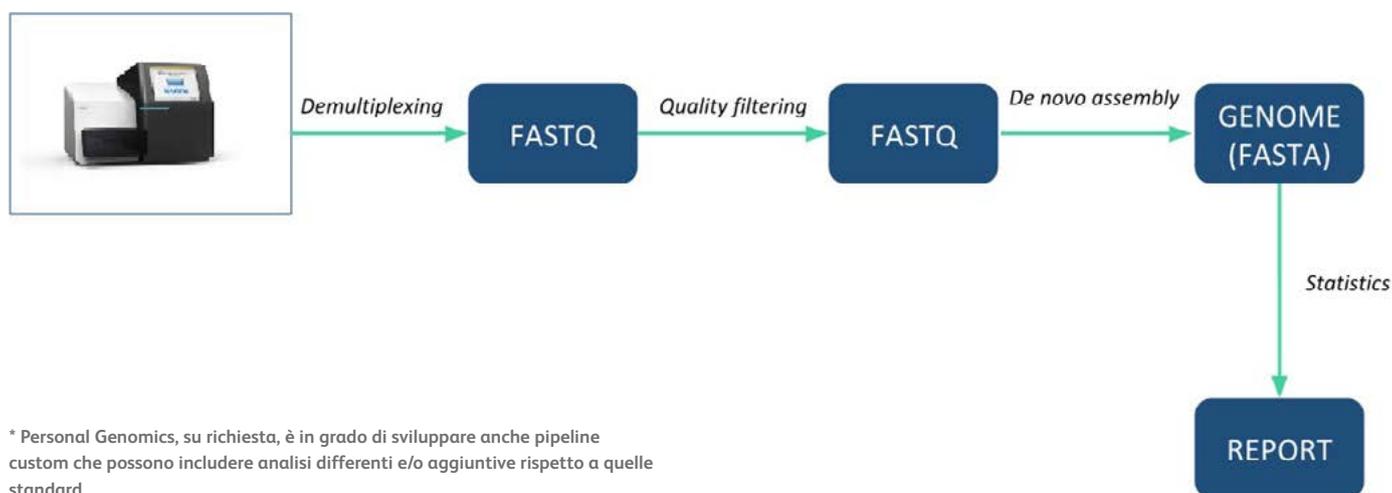


* Personal Genomics, su richiesta, è in grado di sviluppare anche pipeline custom che possono includere analisi differenti e/o aggiuntive rispetto a quelle standard.

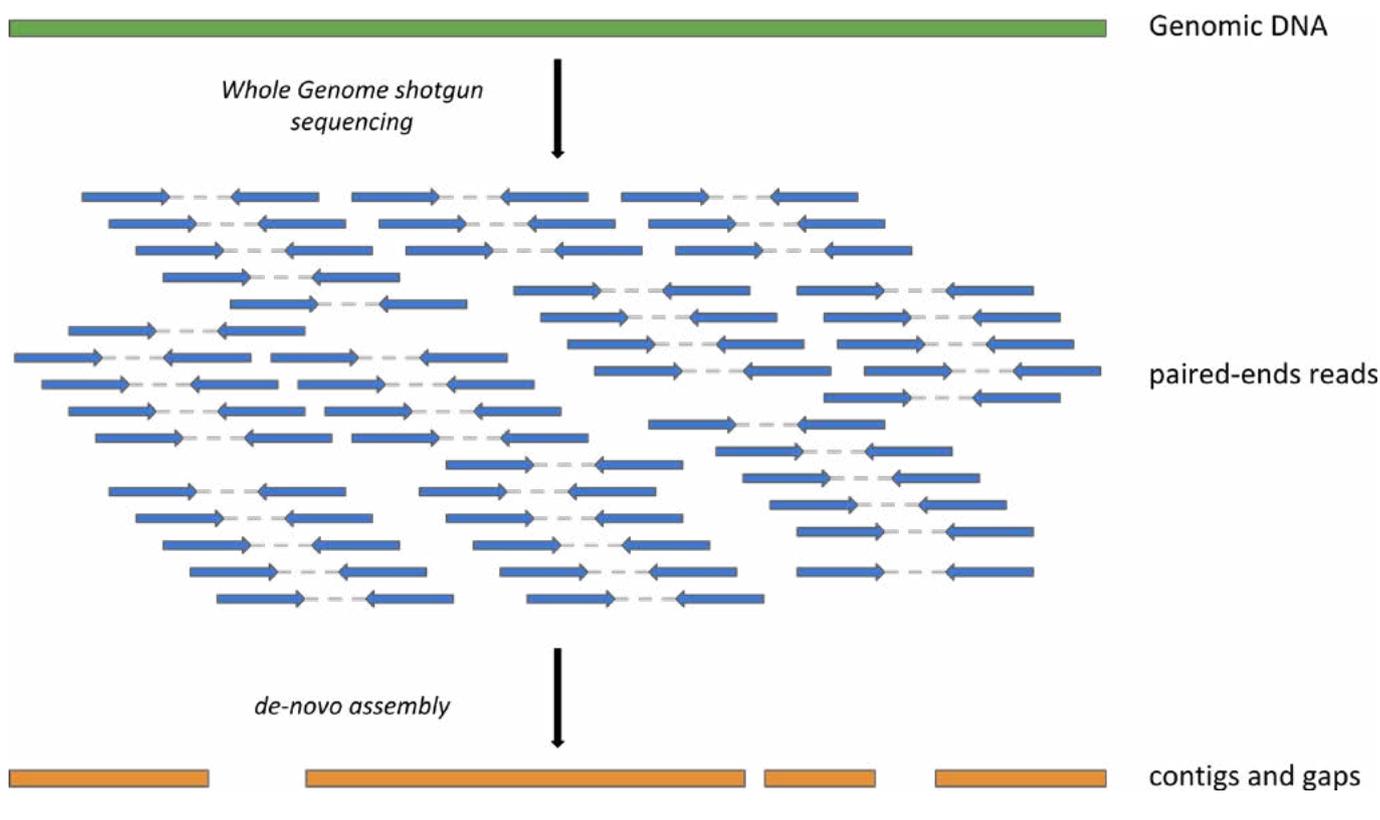
SEQUENZIAMENTO E ASSEMBLAGGIO DEL GENOMA MICROBICO

Sequenziamento shotgun dell'intero genoma batterico e assemblaggio de novo.

ANALISI BIOINFORMATICA *



* Personal Genomics, su richiesta, è in grado di sviluppare anche pipeline custom che possono includere analisi differenti e/o aggiuntive rispetto a quelle standard.



Your solution provider in the world of genomics



Personal Genomics Srl

Via Roveggia, 43b
37136 Verona (VR) Italy
t +39 045 8202351
info@personalgenomics.it
www.personalgenomics.it

SOLGROUP
a breath of life