

Souhrn

Neustálé pokroky v technologii sekvenování nové generace (NGS), jakými jsou kapacita, rychlost a snížené náklady na sekvenování, vedou k revoluci v personalizované medicíně, tím, jak postupně přináší genomiku do rutinní klinické praxe. NGS se stále rychle vyvíjí, avšak variabilita sekvenačních protokolů a validačních postupů je jedním z jeho problematických rysů.

Cílem této práce bylo zhodnotit význam různých zdrojů vzorků a sekvenačních protokolů (od přípravy sekvenační knihovny-sekvenování-analýzi dat) pro zvýšení přesnosti NGS analýzy v diagnostických aplikacích. V první studii, provedené během vypuknutí pandemie COVID-19, jsme vyvinuli NGS protokoly vhodné pro analýzu celého genomu viru SARS-CoV-2. Následně jsme ve druhé studii zkoumali vhodnost lidské genomické DNA (gDNA) pocházející ze slin pro genomickou/genetickou analýzu vybraných variantních k tradiční gDNA pocházející z krve pomocí validovaného NGS protokolu a statistického srovnání získaných dat.

K ověření účinnosti sekvenačních protokolů pro analýzu celého genomu SARS-CoV-2 byly použity dva sekvenační přístupy založené na zachycení části genomu a jeden sekvenační přístup založený na amplifikaci částí genomů. K ověření přesnosti a specifčnosti vyvinutých NGS protokolů byly použity syntetické kontroly. Prokázali jsme, že kvantifikace vzorků pomocí kvantitativní PCR v reálném čase byla správným nástrojem pro následné plexování vzorků. Využití prahových hodnot cyklu vedlo k sekvenačním datům s požadovanou uniformitou pokrytí mezi různými vzorky. Zjistili jsme, že NGS protokol založený na zachycení je nejvhodnější pro celogenomovou analýzu genomu SARS-CoV-2.

V hlavní studii jsme analyzovali, zda lidské sliny mohou sloužit jako alternativní zdroj gDNA ke krvi pro analýzu jednonukleotidových záměn (SNV) a malých inzercí a delecí (indely). Navrhli jsme a ověřili NGS protokoly pro analýzu celého exomu (WES) a celého genomu (WGS) s použitím standardního vzorku Coriel NA12878 a nejnovějšího lidského referenčního genomu GRCh38. Následně jsme analyzovali NGS data z 10 párových vzorků krve a slin získaných za použití stejného Coriel NA12878 NGS protokolu s použitím nástrojů statistické analýzy pro F1 skóre a dalších vybraných sekvenačních parametrů. Medián F1 skóre WES protokolu pro deset párových vzorků krve a slin dosahoval 0,9858 pro SNV a 0,9076 pro indely; pro WGS protokol pak medián F1 skóre dosahoval 0,9761 pro SNV a 0,9511 pro indely. Výsledky této komplexní studie prokázaly vysokou úroveň shody mezi vzorky krve a slin ve srovnání se standardními výsledky Coriel pro F1 skóre pro SNV a indely a jak pro WES, tak WGS protokol.

Obě studie posunuly naše chápání genomového sekvenování vzorků různého původu a prokázaly, že sliny jsou vhodným zdrojem genomických/genetických dat srovnatelných s krví. Tato zjištění ovlivňují další genomický/genetický výzkum a klinické aplikace NGS.