

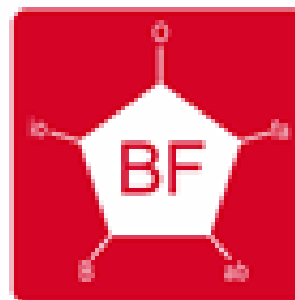
Bio-Fab
research

Servizi di Supporto alla Ricerca

Edificio 10, piano B, stanza 6
telefono: 064990-3053
e-mail: laboratori@biofabresearch.it

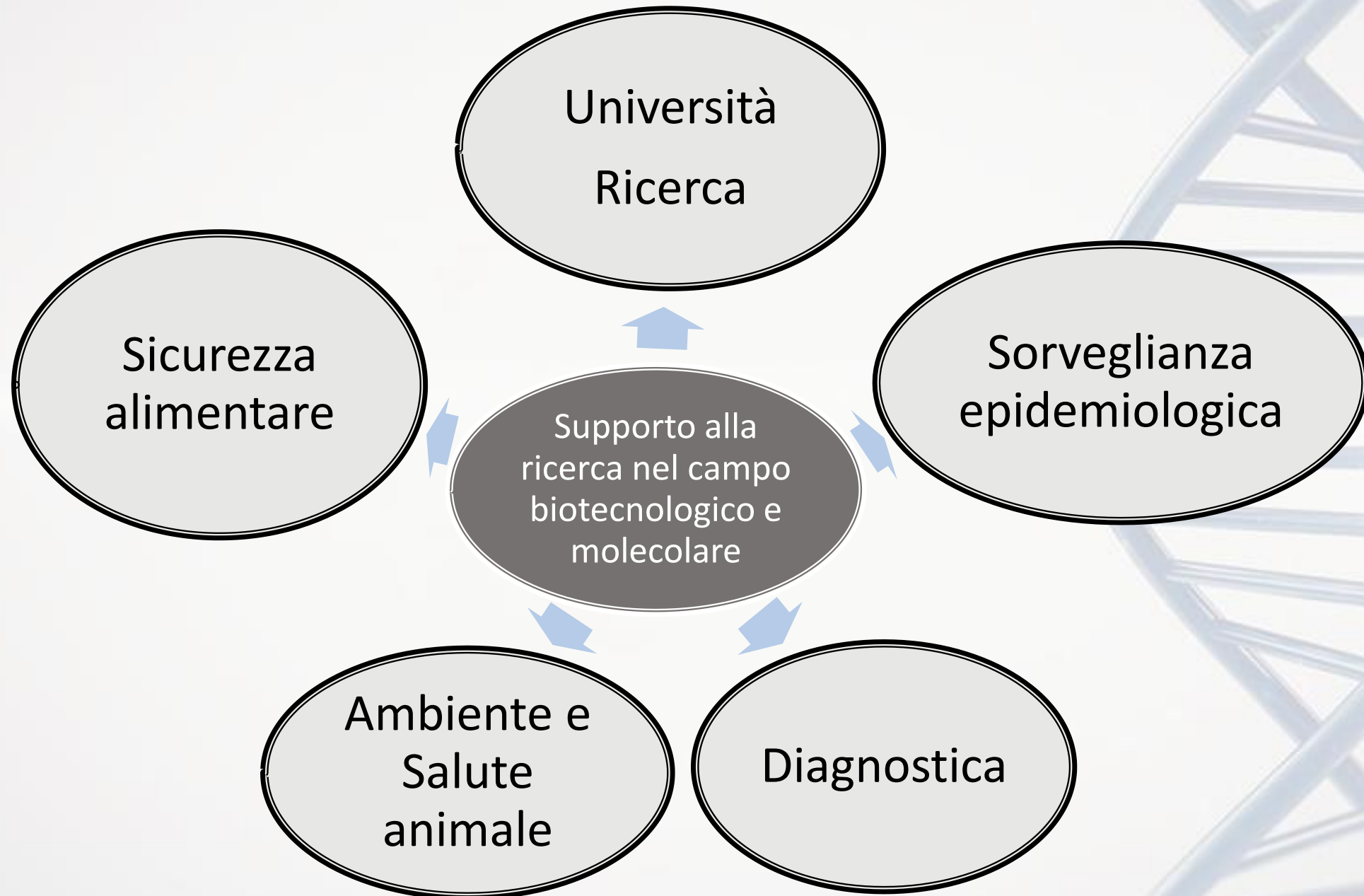
CHI SIAMO

- Nasce nel 2005 inizio attività nel 2006
- Servizi biotecnologici per la genomica
- Team:
- Fabio Riccobono (direzione)
- Giada Galleazzi (sequenziamento-genotyping)
- Federico Andreani (sequenziamento-NGS)
- Elena Diaconu (sequenziamento-Bioinformatica)
- Claudia Di Manno (amministrazione)
- Laboratori: Nouscom; DBBCD; ISS;
- Sede operativa: Tecnopolo di Castel Romano



Bio-Fab
research
Servizi di Supporto alla Ricerca

ATTIVITA' E CAMPI D'AZIONE



COLLABORAZIONE ISS BIO-FAB RESEARCH

- Dopo tanti anni di lavoro dall'esterno Bio-Fab ha avviato una collaborazione per lo sviluppo di servizi tecnico scientifici all'interno di ISS
- Bio-Fab ha diverse esperienze nel passato di sviluppo core di facility in varie istituzioni. Scelta strategica vincente in accordo con ISS
- Interazione e collaborazione (IRBM; DMISM presso Policlinico Umberto I; DMISM presso SSN-LAB; DBBCD Università di Roma La Sapienza; Nouscom; ISS)



CORE DI FACILITY

- Tecniche e le biotecnologie in rapida e continua evoluzione
- Outsourcing vantaggi (meno personale, meno strumentazione, costi contenuti)
- Outsourcing svantaggi (poca interazione, battaglia al prezzo più basso, diminuzione della qualità, allungamento dei tempi di risposta)
- Core di facility evoluzione dell'outsourcing
- Centralizzazione dei servizi e della strumentazione



PROGETTI DI RICERCA

- Sinergia pubblico privato:
supporto nell'attività tecnico-scientifica; aumento di risorse umane e strumentali;
partecipazione a progetti di ricerca in cui sia prevista la collaborazione con le PMI



ATTIVITA' DI RICERCA E SVILUPPO

Alcuni dei nostri progetti finanziati



Finanziaria laziale
di sviluppo

2012/2015

REGIONE LAZIO - DISTRETTO TECNOLOGICO DELLE BIOSCIENZE
PROGETTI DI RICERCA INDUSTRIALE E/O SVILUPPO SPERIMENTALE IN AMBITO
SANITARIO di cui all'art.33 Comma3 lett. C) della L.R. 28/12/2007 n. 26

Titolo: Utilizzo dei MicroRNA per la diagnosi e la terapia delle neoplasie e delle
malattie genetiche



Unione europea



REGIONE
LAZIO



2018/2019

*Avviso Pubblico "LIFE 2020" di cui alla Det. n. G08726 del 29/07/2016 – POR FESR LAZIO 2014 – 2020 –
Progetti integrati*

PROGETTO COFINANZIATO DALL'UNIONE EUROPEA

Bio-Fab Research s.r.l. - Identificazione e caratterizzazione di marcatori biologici per la diagnosi precoce
dei Disturbi dello Spettro Autistico (ASD)

BoASD (Biomarkers of Autism Spectrum Disorders)

NGS FAST & BIO-FAB RESEARCH

- l'inserimento della tecnologia **Illumina**
- Bio-Fab ha installato in laboratorio un **MiSeq** con caratteristiche simili e complementari a **Ion Gene Studio S5** già' esistente.
- Possibilità di interagire direttamente con il laboratorio (palazzina 10 pianob st.6) e con il personale della Bio-Fab
- **servizio di bioinformatica** in loco per l'interpretazione dei dati di NGS, il supporto alle strategie di esperimento ed alla pubblicazione dei lavori scientifici.
- Sviluppo e ottimizzazione di nuovi protocolli e **nuove tecnologie** (sequenziamento di terza generazione Minlon Oxford Nanopore);



The screenshot shows the 'Sequencing Analysis Viewer' software interface. It features a navigation bar with 'Analysis', 'Imaging', 'Summary', and 'Indexing' tabs. Below the navigation bar is a table with columns: Lane, Tile, Cycle, Read, Cycle Within Read, Density (Reads/Tile), Density Pf (Reads/Tile), Cluster Count (K), and Cluster Pk. The table contains 24 rows of data for Lane 1, with Cycle numbers from 1 to 24. To the right of the table is a circular DNA sequence visualization with letters A, C, G, T. Below the table are two small images showing sequencing data visualizations.

Lane	Tile	Cycle	Read	Cycle Within Read	Density (Reads/Tile)	Density Pf (Reads/Tile)	Cluster Count (K)	Cluster Pk
1	1101	1	1	1	1428	1286.5	888.4	800.0
1	1101	2	1	2	1428	1286.5	888.4	800.0
1	1101	3	1	3	1428	1286.5	888.4	800.0
1	1101	4	1	4	1428	1286.5	888.4	800.0
1	1101	5	1	5	1428	1286.5	888.4	800.0
1	1101	6	1	6	1428	1286.5	888.4	800.0
1	1101	7	1	7	1428	1286.5	888.4	800.0
1	1101	8	1	8	1428	1286.5	888.4	800.0
1	1101	9	1	9	1428	1286.5	888.4	800.0
1	1101	10	1	10	1428	1286.5	888.4	800.0
1	1101	11	1	11	1428	1286.5	888.4	800.0
1	1101	12	1	12	1428	1286.5	888.4	800.0
1	1101	13	1	13	1428	1286.5	888.4	800.0
1	1101	14	1	14	1428	1286.5	888.4	800.0
1	1101	15	1	15	1428	1286.5	888.4	800.0
1	1101	16	1	16	1428	1286.5	888.4	800.0
1	1101	17	1	17	1428	1286.5	888.4	800.0
1	1101	18	1	18	1428	1286.5	888.4	800.0
1	1101	19	1	19	1428	1286.5	888.4	800.0
1	1101	20	1	20	1428	1286.5	888.4	800.0
1	1101	21	1	21	1428	1286.5	888.4	800.0
1	1101	22	1	22	1428	1286.5	888.4	800.0
1	1101	23	1	23	1428	1286.5	888.4	800.0
1	1101	24	1	24	1428	1286.5	888.4	800.0

SVILUPPO BIOTECNOLOGICO DAL SANGER AL SEQUENZIAMENTO DI NUOVA GENERAZIONE

Sanger Sequencing



Strumentazione: Applied Biosystems
Tecnologia: Dye terminator
(**Prima** generazione di sequenziamento)

Next Generation Sequencing



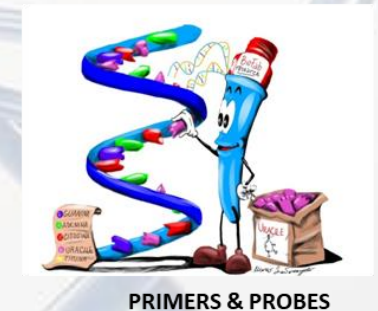
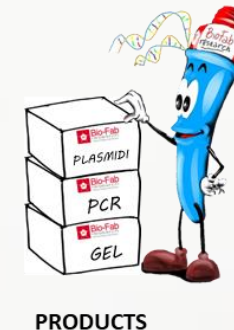
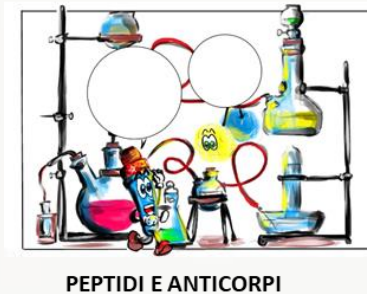
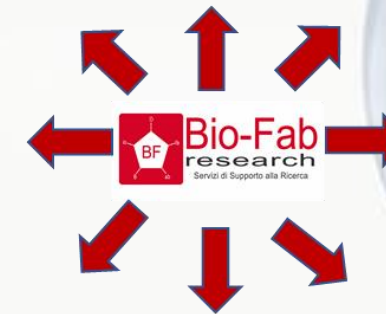
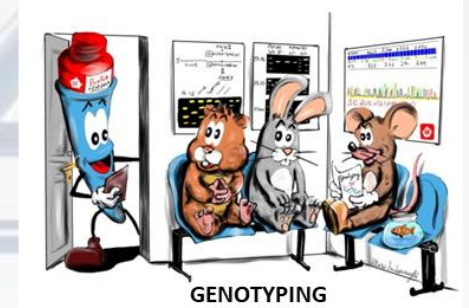
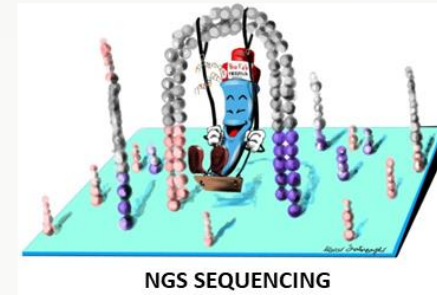
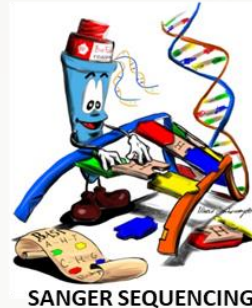
Strumentazione: Illumina
Tecnologia: Solexa Technology (SBS seq)
(**Seconda** generazione di sequenziamento)



Strumentazione: Oxford Nanopore
Technologies - MinION
Tecnologia: Nanopori
(**Terza** generazione di sequenziamento)

SERVIZI PER LA BIOLOGIA MOLECOLARE BIO-FAB

- Listino convenzionato per tutti i servizi della Bio-Fab research
- Insieme di tecniche per il supporto alla ricerca
- La Bio-Fab Research da importanza principalmente alla qualità dei servizi cercando di mantenere i prezzi il più possibile accessibili. Il valore aggiunto lo si ottiene tramite la collaborazione, la competenza e l'interazione con il personale
- <https://www.biofabresearch.it/iss/>
user: ISS
password: @iss2018@



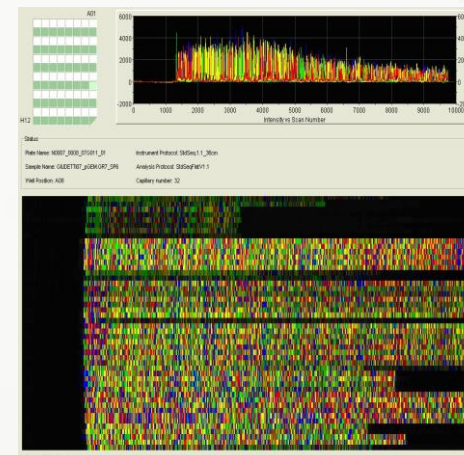
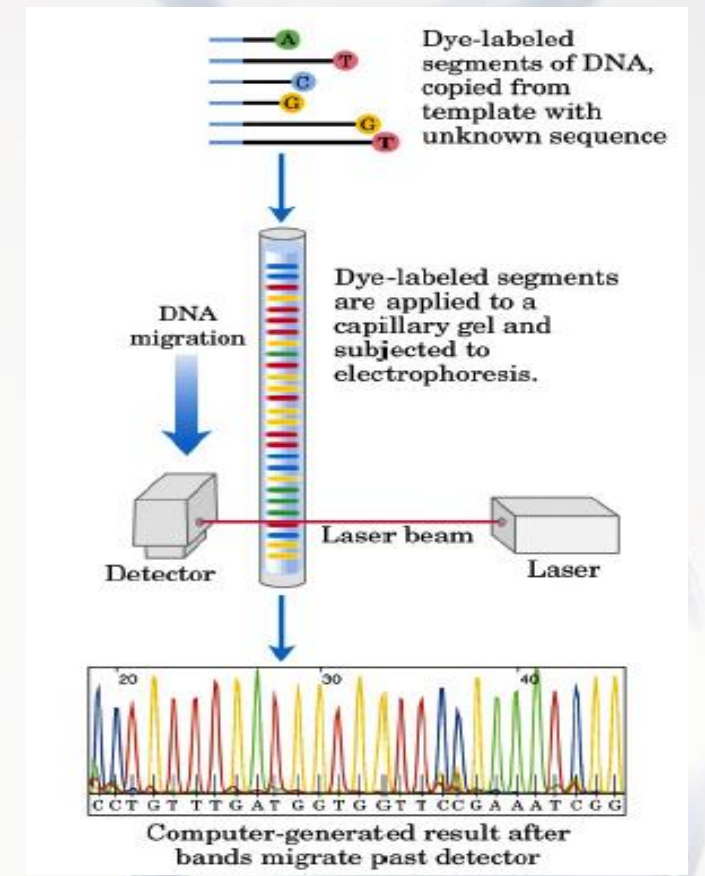
SANGER

Perché si sequenzia?

- Informazioni su cloni, presenza e orientamento inserto.
- Informazioni su amplificati di DNA, presenza di aspecifici.
- Presenza di siti di restrizioni, inserzioni, delezioni, sostituzioni, mutazioni puntiformi, eterozigosi.
- Diagnosi di malattie genetiche.
- Presenza di regioni codificanti e non , regioni regolatrici, ecc.

Che servizi offre BioFab?

- Sequenze fino a 1000 nt con qualità Phred20
- Sequenziamento di DNA plasmidico o di PCR
- Purificazione PCR + Sequenziamento PCR
- Sintesi oligo + sequenziamento
- Primer Walking ssDNA e dsDNA
- Drop box a Fisiologia per consegna campioni e ritiro oligo
- Consegna risultati in 24h
- Collaborazione e interpretazione dei risultati



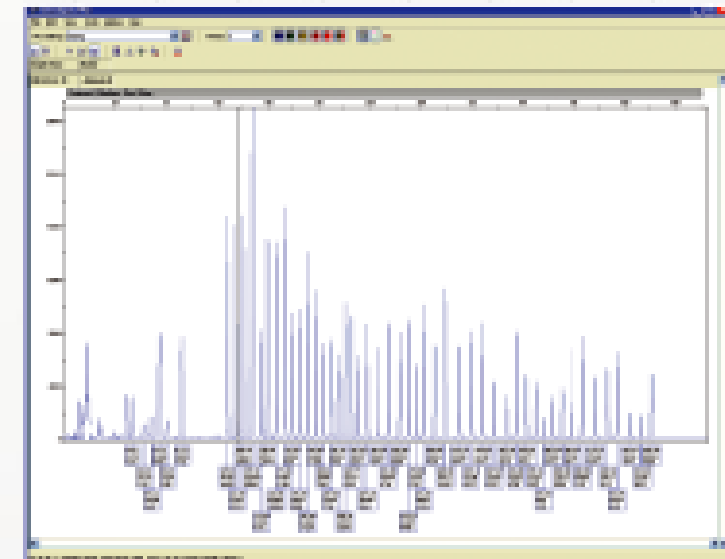
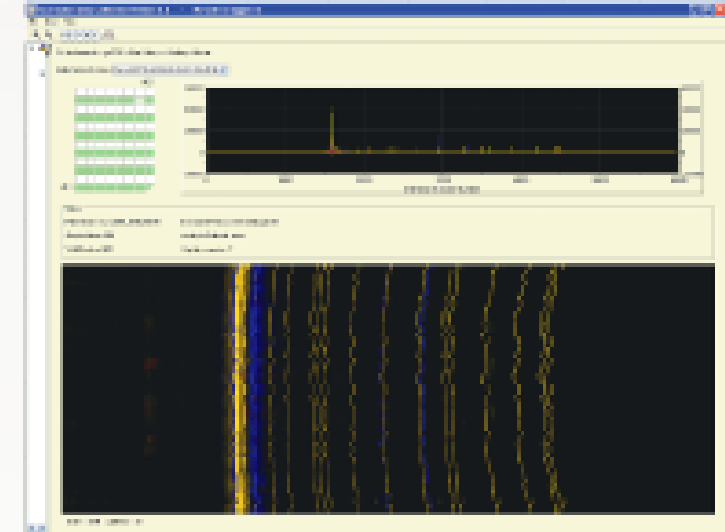
Analisi di Frammenti

Vantaggi:

- maggiore risoluzione e sensibilità rispetto al gel di agarosio
- possibilità di avere la misura precisa della lunghezza del frammento in riferimento ad uno standard di peso molecolare interno (Liz 500 –Liz 600) che viene corso insieme ai campioni.
- possibilità di avere una misura quantitativa relativa in base all'ampiezza del picco e all'intensità del segnale.
- possibilità di analizzare molti campioni contemporaneamente.

Che servizi offre BioFab ?

- Analisi di frammenti di amplificati di PCR derivanti da protocolli e tecniche di natura diversa
- Filtro DS-33 con possibilità di utilizzare fino a 4 colori diversi in un unico campioni (6-FAM, VIC, NED e PET.)
- Diversi size standard in base alle richieste (500Liz -600Liz)
- **I risultati vengono inviati in 24 ore** e riassunti in un foglio excel con size, l'area dei picchi ed i data point con le immagini dei plot corrispondenti e invio del file grezzo fsa
- Drop box a Fisiologia per consegna campioni
- Collaborazione e interpretazione dei risultati



Analisi di Frammenti

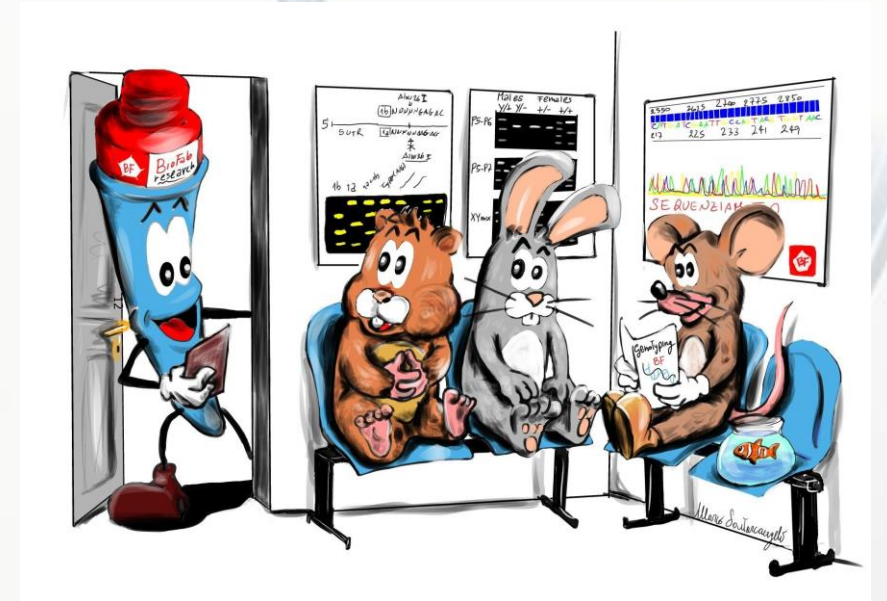
Alcune delle possibili applicazioni :

- **Microsatelliti**
- **RFLP** (restriction fragment length polymorphism)
- **MLPA** (Multiplex ligation-dependent probe amplification)
- **MLVA** (Multiple-locus variable-number of tandem-repeats analysis)

Genotipizzazione di animali di laboratorio:

Il servizio permette l'identificazione e la caratterizzazione di animali di laboratorio e non solo e prevede:

- l'estrazione di DNA genomico a partire da biopsie
- la sintesi degli oligo per amplificare il gene/i
- PCR
- gel di agarosio (a richiesta può essere utilizzato il sequenziatore per analizzare i profili di amplificazione)
- diagnosi



SUPPORTO ALLA RICERCA

- Clonaggio standard da PCR (TA cloning)
- Clonaggio personalizzato in un vostro vettore
- Mutagenesi sito specifica.
- Sintesi di geni sintetici con possibilità di sub-clonaggio in un vostro vettore
- Sintesi di peptidi
- Sintesi di anticorpi poli e mono-clonali

Tutto da noi.....un solo ordine!

Siamo presenti anche sul Mepa

SEQUENZIAMENTO DI NUOVA GENERAZIONE

Che cos'è ?

«Con il termine Next Generation Sequencing (NGS) o “**sequenziamento in parallelo**” si indicano una serie di tecnologie che permettono di sequenziare **grandi genomi** in un tempo ristretto, dell'ordine di giorni o settimane.

- Non è più necessaria la fase dell'elettroforesi
- **Non è più necessario clonare il DNA in vettori**
- **Vengono analizzate milioni di corse in parallelo**
- **Notevole riduzione dei tempi e dei costi**
- La lunghezza delle singole letture è minore rispetto al Sanger (da 30 a 600 bp circa)
- Viene generata un'enorme mole di dati (necessità di analisi Bioinformatica)

ECCO UN ELENCO DELLE POSSIBILI APPLICAZIONI:

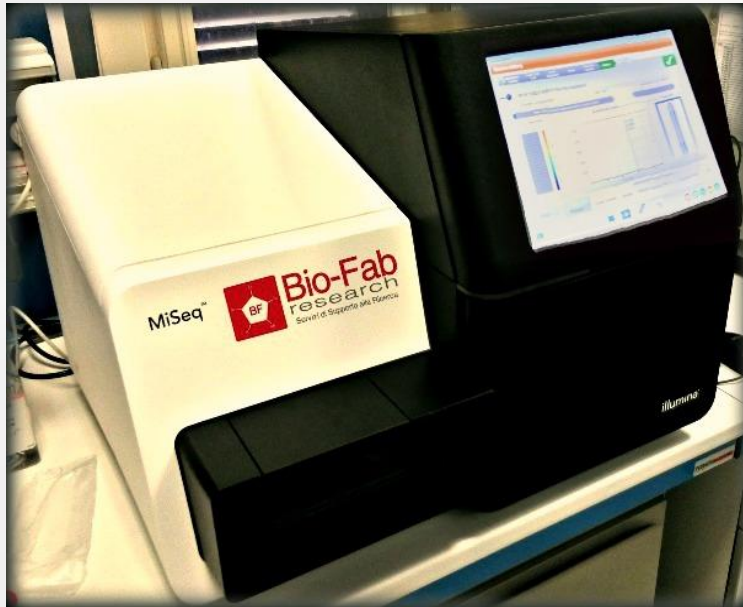
- **Sequenziamento di interi genomi:** sequenziamento de novo di genomi, di organismi superiori, virali, batterici, fungini per allestire mappe genetiche e fisiche del DNA degli organismi viventi;
- **Re-sequencing:** studiare polimorfismi (SNPs), regioni genomiche associate a patologie, mutazioni somatiche o ri-annotare sequenze ottenute da precedenti sequenziamenti;
- **Deep-sequencing:** la scoperta di mutazioni che determinano i diversi fenotipi sono un caposaldo nella genetica, grazie all'elevata sensibilità, quantità di dati ottenuti e velocità le nuove piattaforme consentono di individuare varianti rare, diminuendo notevolmente il costo della ricerca;
- **Applicazioni farmacogenetiche:** dato che le risposte ai farmaci variano molto da paziente a paziente si cerca di individuare quali caratteristiche geniche determinino la risposta ai farmaci;

ECCO UN ELENCO DELLE POSSIBILI APPLICAZIONI:

- **Metagenomica:** analisi contemporanee del genoma di tutti i micro-organismi presenti in un particolare ambiente, alla ricerca di nuove specie;
- **Paleogenomica:** analisi di genomi a partire da reperti fossili di organismi estinti;
- **Epigenetica:** studio dei pattern di metilazione e delle modificazioni dei nucleosomi, analisi del DNA cromatinico immunoprecipitato (ChIP-seq)
- **Analisi di trascrittoma:** analisi dell'espressione dei geni negli RNA messaggeri di un intero organismo o di un particolare organo, tessuto o cellula in un particolare punto dello sviluppo dell'organismo o sotto particolari condizioni ambientali; lncRNA; circRNA;
- **Analisi del miRNoma:** analisi del profilo di espressione dei microRNA in differenti condizioni o stadi di sviluppo, studio del ruolo nella tumorigenesi umana per lo sviluppo di nuovi marcatori diagnostici e bersagli terapeutici, .

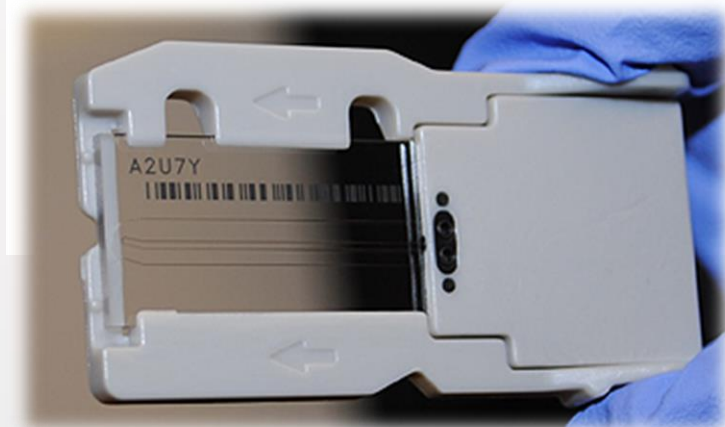
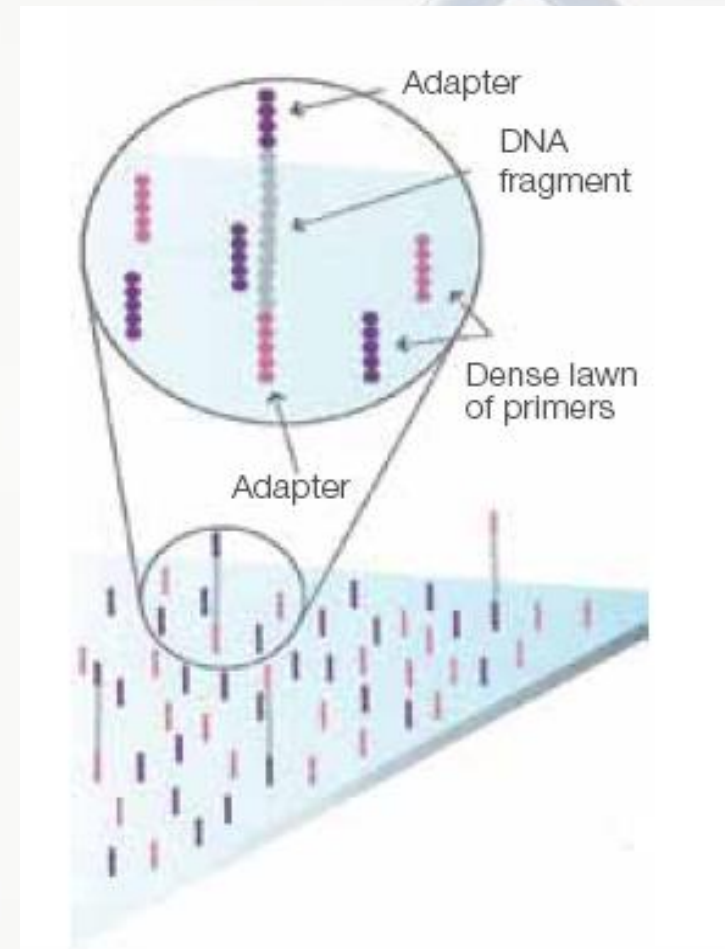
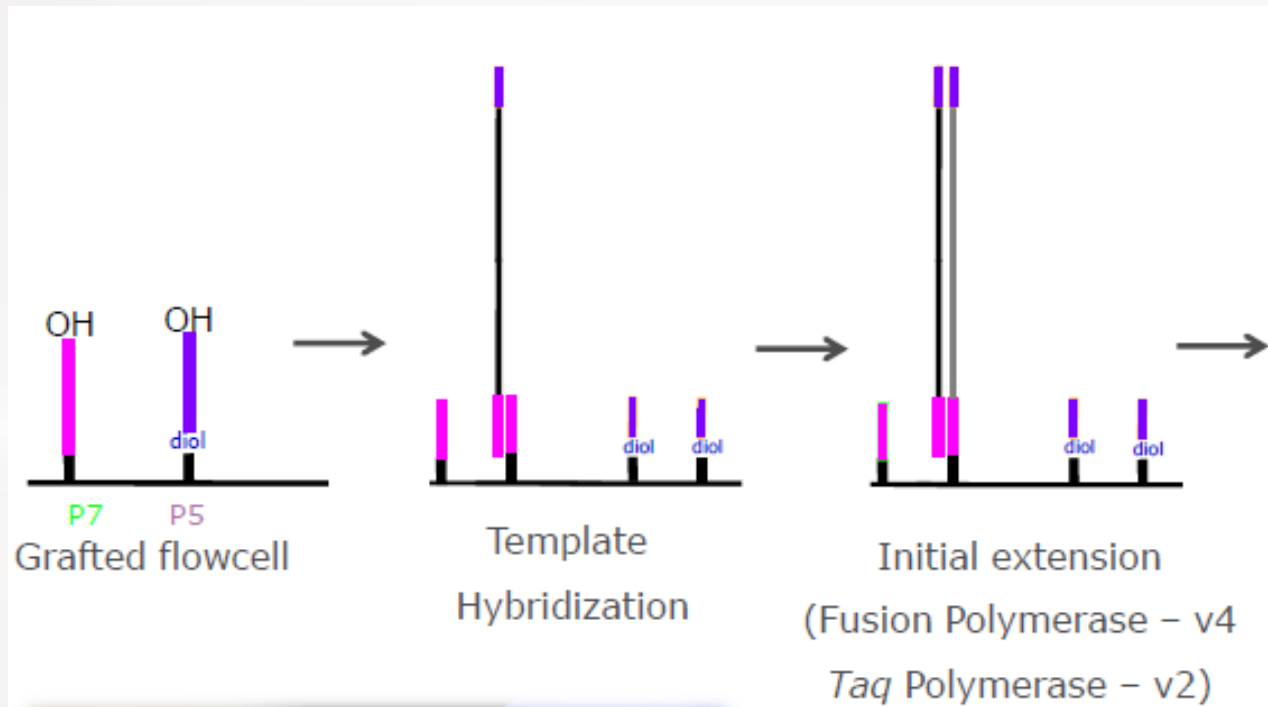
STRUMENTAZIONE NGS BIO-FAB IN LABORATORIO

MiSeq - Illumina



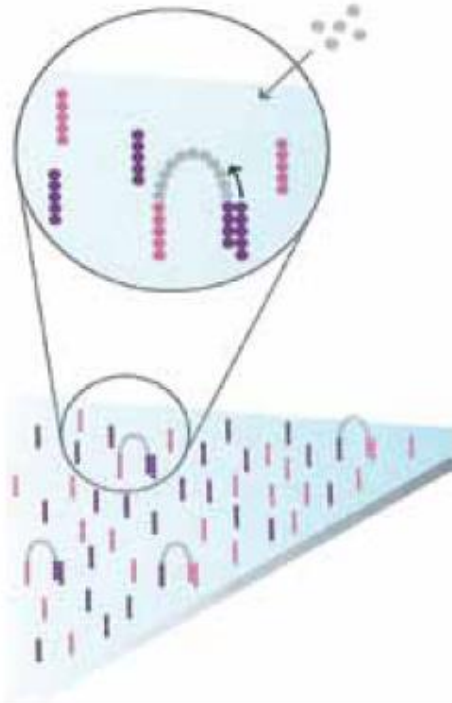
- Reads number: **25M** di reads in SR o **50M** di reads in PE
- Output: **15Gbp** max
- Letture: **1X50** fino a **2X300** (600 nucleotidi)
- Fino a 96 ampliconi o 48 small genome in contemporanea

Illumina Sequencing Technology



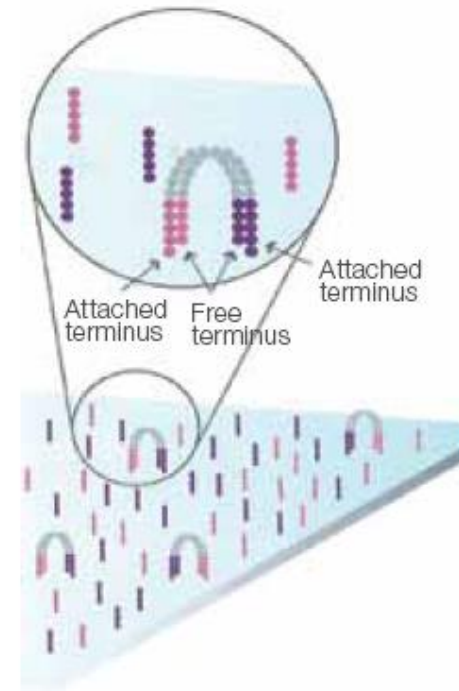
Illumina Sequencing Technology

Figure 4: Bridge Amplification



Add unlabeled nucleotides and enzyme to initiate solid-phase bridge amplification.

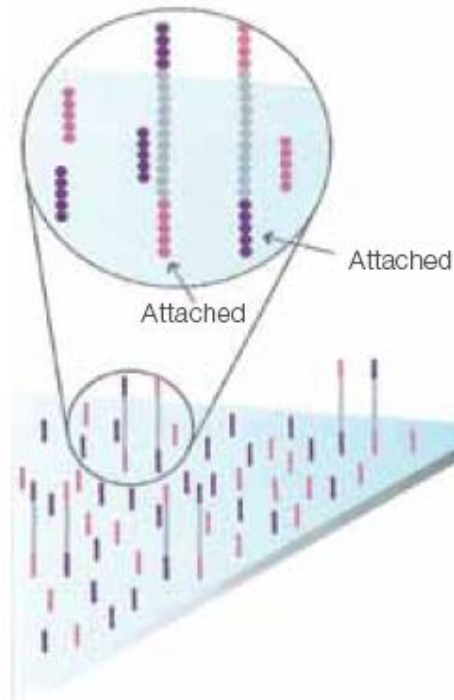
Figure 5: Fragments Become Double Stranded



The enzyme incorporates nucleotides to build double-stranded bridges on the solid-phase substrate.

Illumina Sequencing Technology

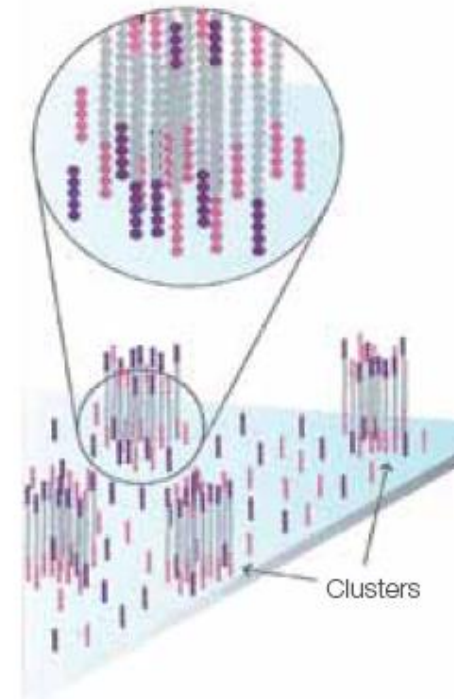
Figure 6: Denature the Double-Standed Molecules



Denaturation leaves single-stranded templates anchored to the substrate.

Figure 7: Complete Amplification

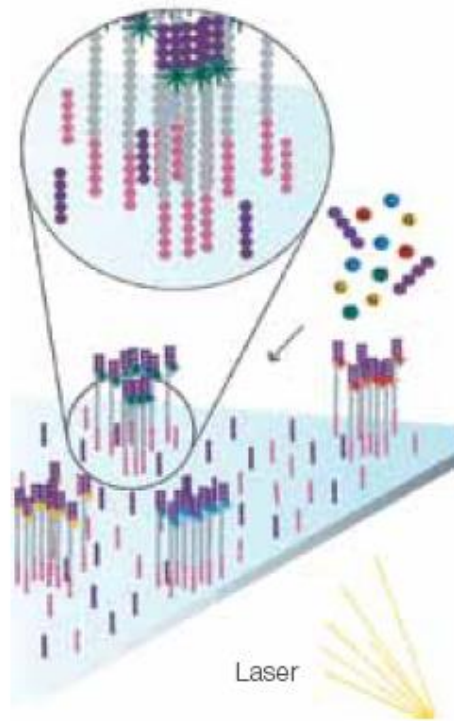
The Flow Cell can contain >320 million clusters with about 1000 molecules



Several million dense clusters of double-stranded DNA are generated in each channel of the flow cell.

Illumina Sequencing Technology

Figure 8: Determine First Base



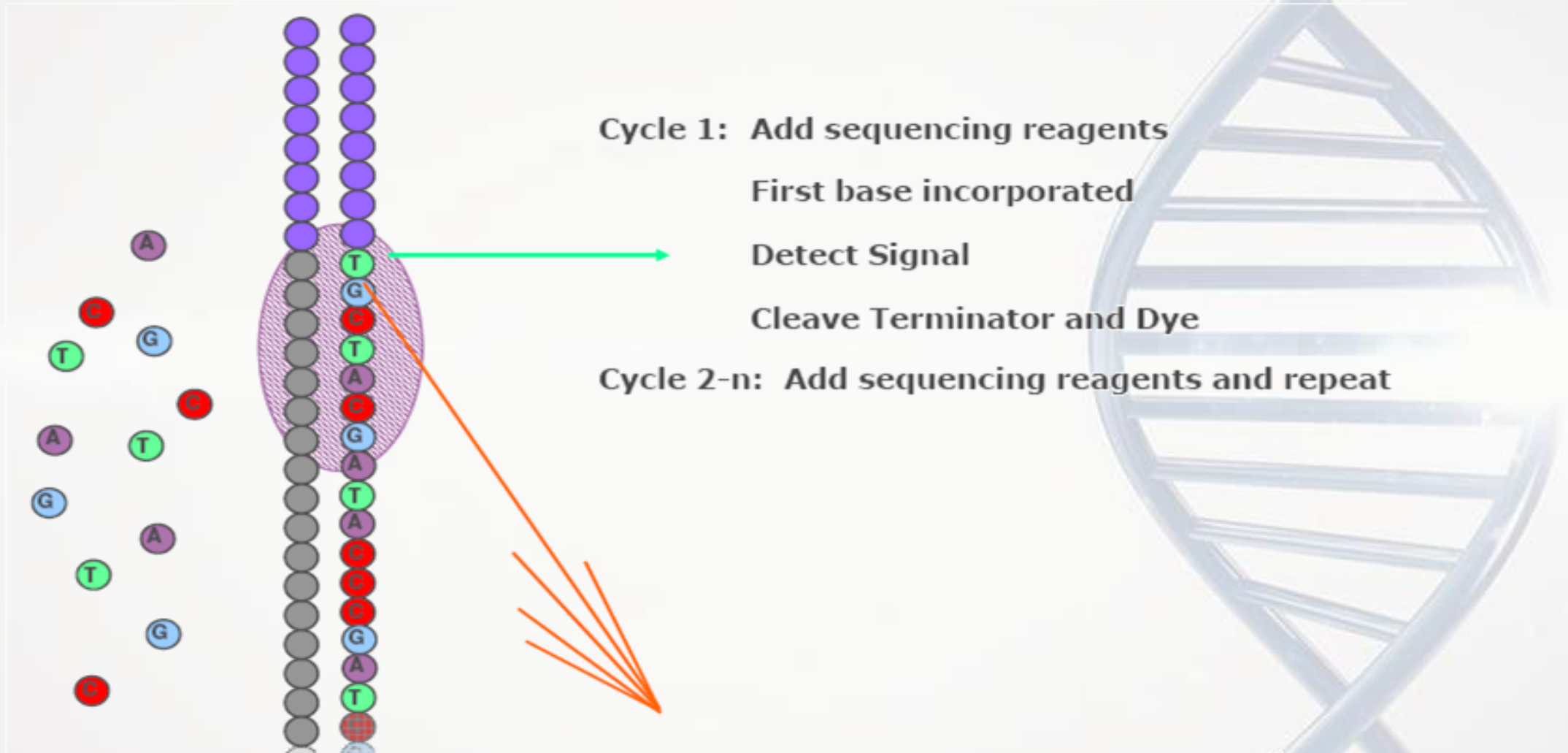
The first sequencing cycle begins by adding four labeled reversible terminators, primers, and DNA polymerase.

Figure 9: Image First Base

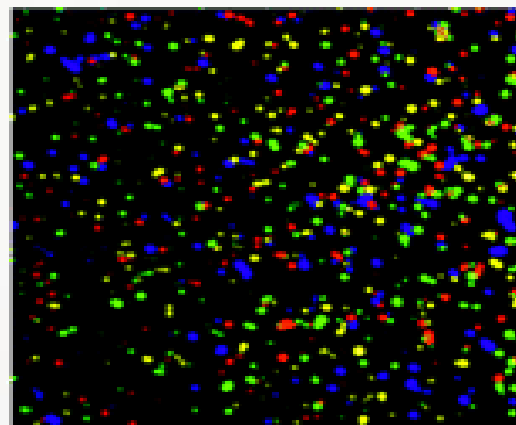
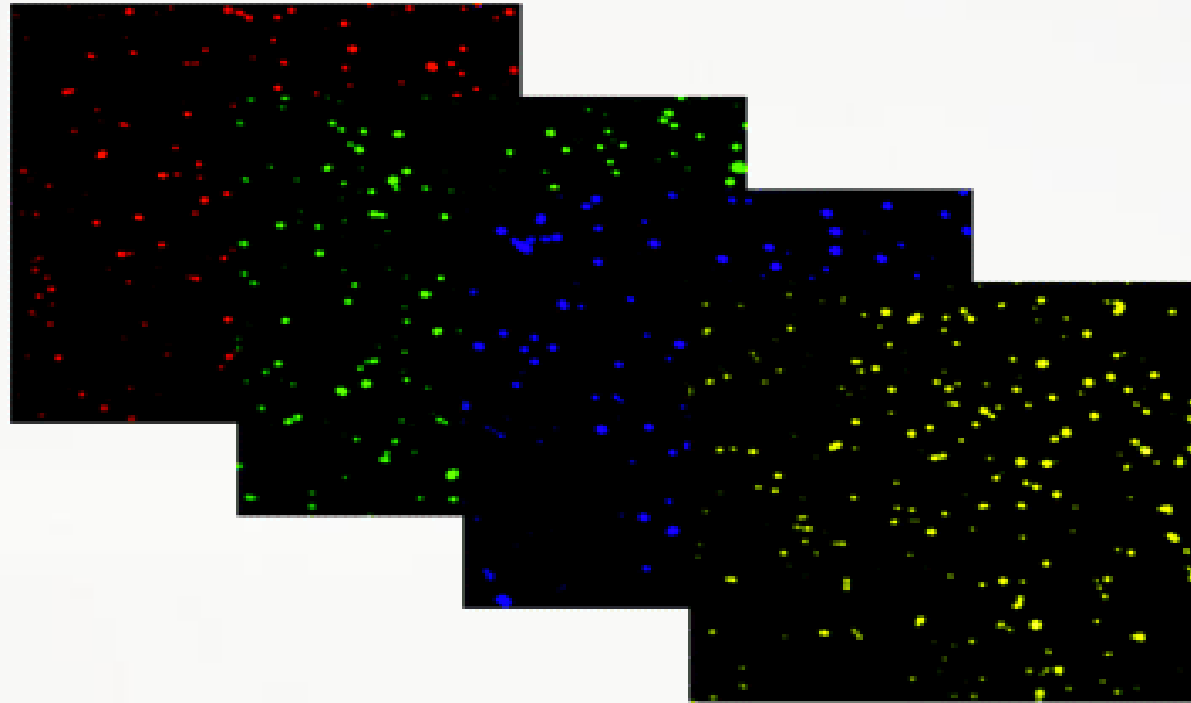


After laser excitation, the emitted fluorescence from each cluster is captured and the first base is identified.

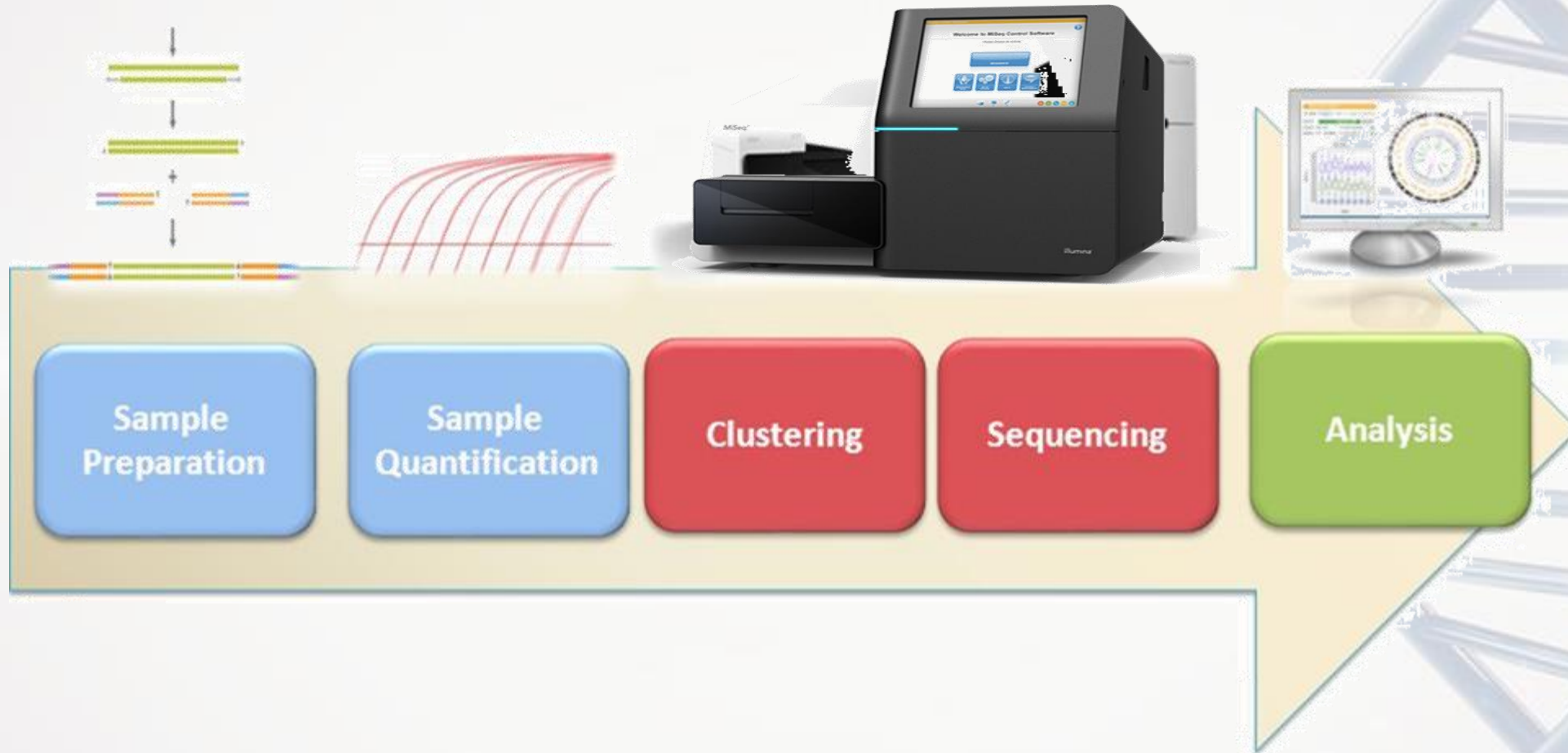
Illumina Sequencing Technology



Illumina Sequencing Technology



Illumina Workflow



QUALITY-CHECK DEL MATERIALE DI PARTENZA E DELLA LIBRARY

DNA sample

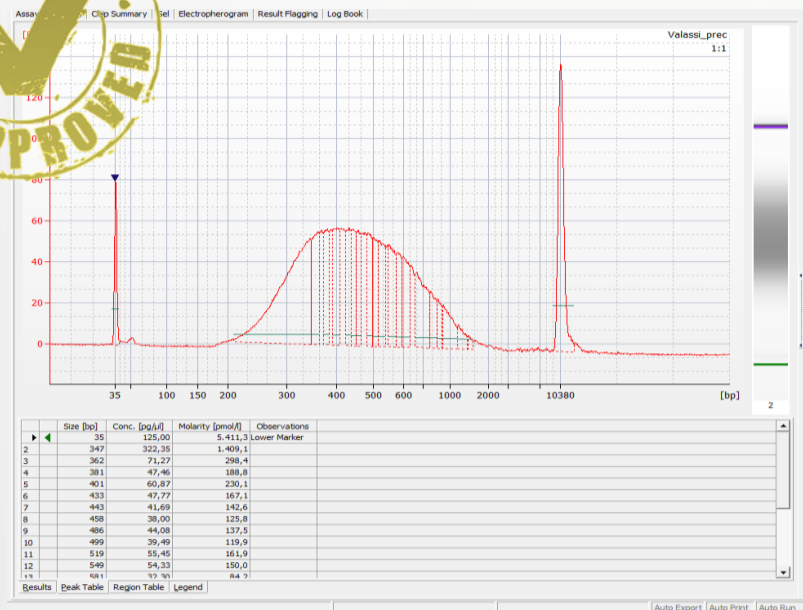
- QC NanoDrop
- QC Qubit



- PCR
- Tagmentation

Library prep

Check and quantify library
Agilent 2100 Bioanalyzer



1. Add sample

2. Start chip run

3. Watch real-time data

APPLICAZIONI E PRESTAZIONI OFFERTE

- Sequenziamento di piccoli genomi (**plasmidi, mitocondriale, virus, adenovirus, batteri**) fino al sequenziamento di genomi più grandi e complessi (**funghi**)
- **Amplicon sequencing**, approccio che permette di analizzare la variazione genetica in specifiche regioni genomiche. Il sequenziamento ultra-profondo dei prodotti PCR consente un'efficiente identificazione e caratterizzazione delle varianti
- **Pannelli custom o Inventoried Illumina** per studiare polimorfismi (SNPs), regioni genomiche associate a patologie, mutazioni somatiche o ri-annotare sequenze ottenute da precedenti sequenziamenti;
- Studi di **metagenomica** tramite l'analisi del 16S o dell'ITS, con possibilità di estendere gli studi ad altre regioni d'interesse del ricercatore.
- Analisi del **miRNoma**: analisi del profilo di espressione dei microRNA in differenti condizioni o stadi di sviluppo, studio del ruolo nella tumorigenesi umana per lo sviluppo di nuovi marcatori diagnostici e bersagli terapeutici

BIOINFORMATIC ANALYSIS



Primary Data Analysis

- **MiSeq Real-Time Analysis:** Real time analysis (RTA) is a software application that helps perform primary analysis for Illumina's sequencing instruments. RTA runs locally on the instrument control PC and performs base call and quality scoring.

Secondary Data Analysis

- **MiSeq Reporter Software:** MiSeq Reporter (MSR) Software performs base calls generated on-instrument during the sequencing run by Real Time Analysis (RTA) software. It produces information about alignment, structural variants, and contig assemblies for each genome and sample. It performs analysis based on the workflow specified in the sample sheet.



Cosa producono i sequenziatori?

FASTQ has emerged as a common file format for sharing sequencing read data combining both the **sequence** and an associated per base **quality** score.

It provides a simple extension to the FASTA format...

```
Line 1 @SRR001666.1 071112_SLXA-EAS1_s_7:5:1:817:345 length=36
Line 2 GGGTGATGGCCGCTGCCGATGGCGTCAAATCCCACC
Line 3 +SRR001666.1 071112_SLXA-EAS1_s_7:5:1:817:345 length=36
Line 4 !!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!9!G9!C
```

Because of its **simplicity** 😏, the FASTQ format has become widely used as a simple interchange file format.



Controllo qualità e trimming

Basic Statistics

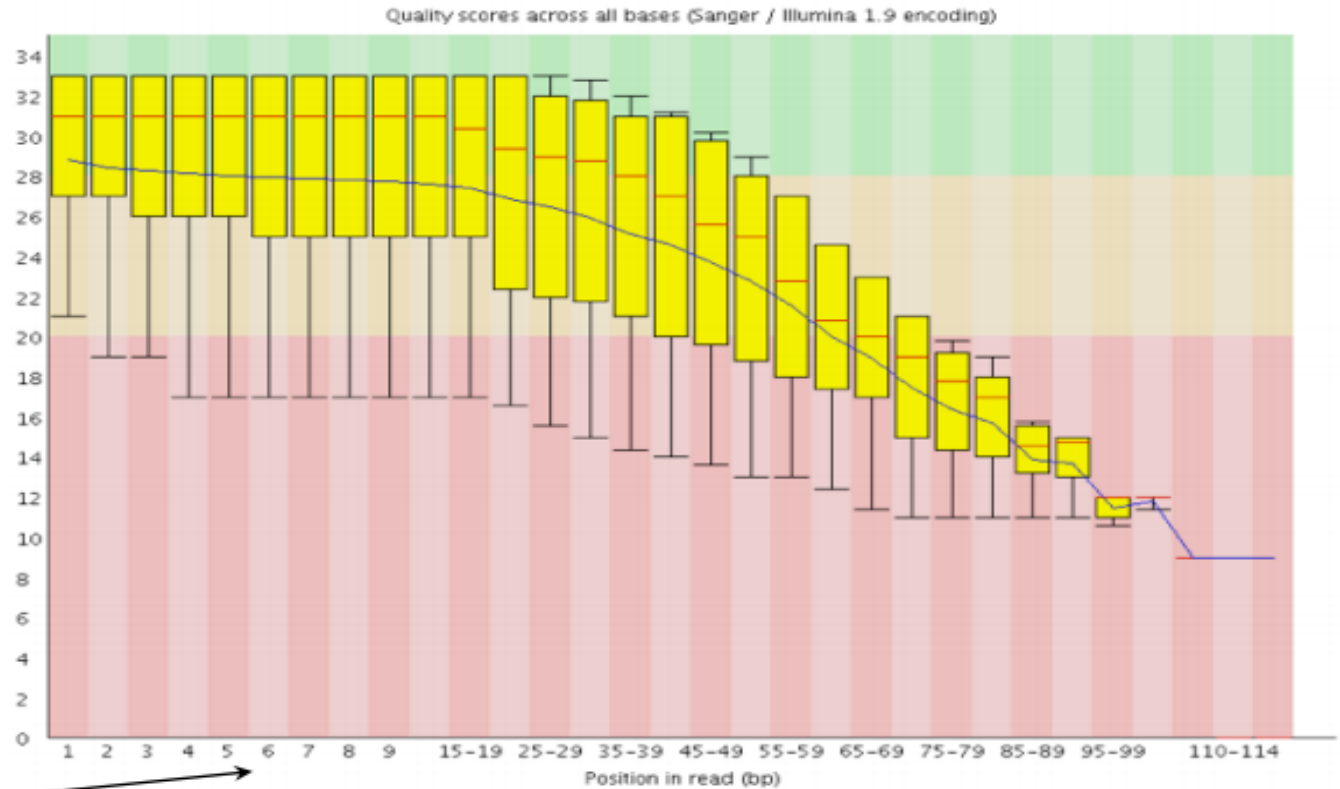
Measure	Value
Filename	B13_212.fastq
File type	Conventional base calls
Encoding	Sanger / Illumina 1.9
Total Sequences	522099
Filtered Sequences	0
Sequence length	16-115
%GC	50

quality (Scale 0-40)

Phred Quality Score	Probability of incorrect base call	Base call accuracy
10	1 in 10	90%
20	1 in 100	99%
30	1 in 1000	99.9%
40	1 in 10,000	99.99%
50	1 in 100,000	99.999%
60	1 in 1,000,000	99.9999%

read position

Per base sequence quality



Scegliere il giusto algoritmo di assemblaggio

Assembly de novo

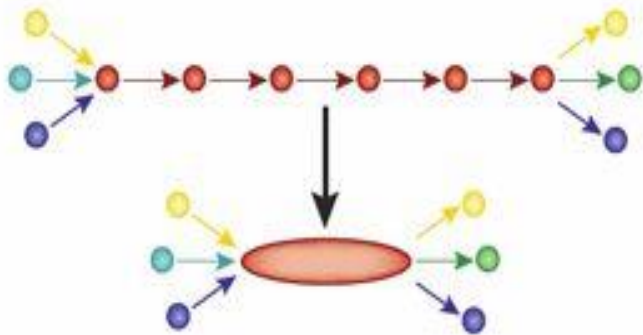
1. Fragment DNA and sequence



2. Find overlaps between reads

...AGCCTAGACCTACA **GGATGCGCGACACGT**
GGATGCGCGACACGT CGCATATCCGGT...

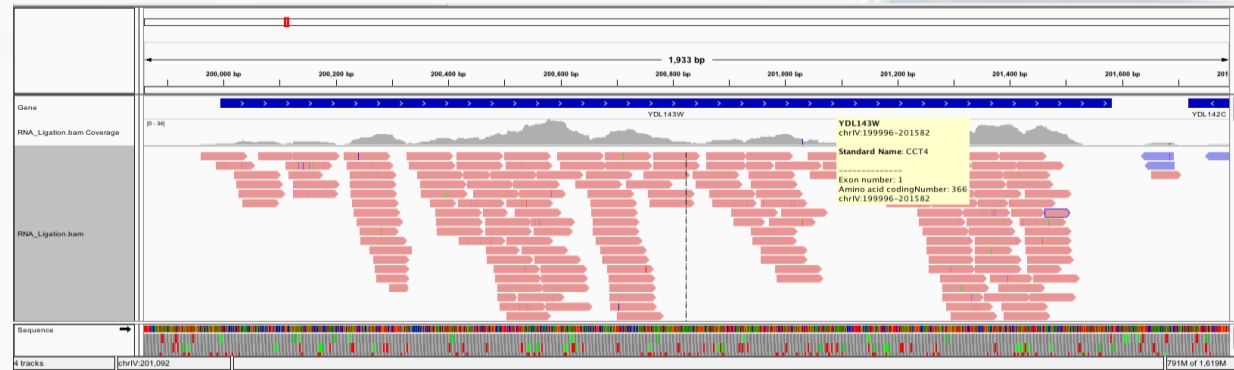
3. Assemble overlaps into contigs



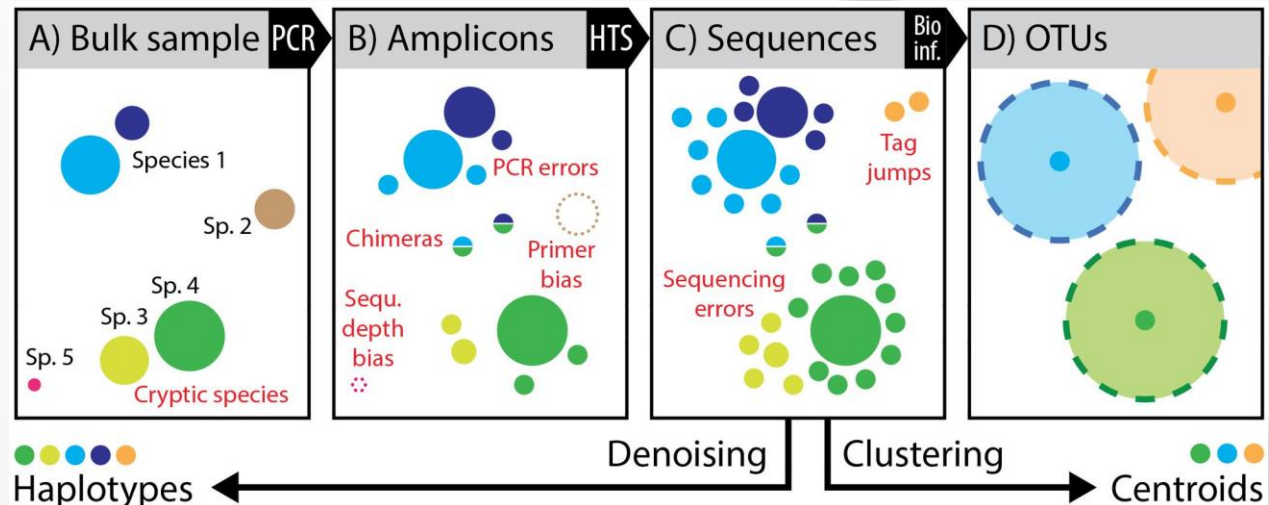
4. Assemble contigs into scaffolds



Assembly con reference

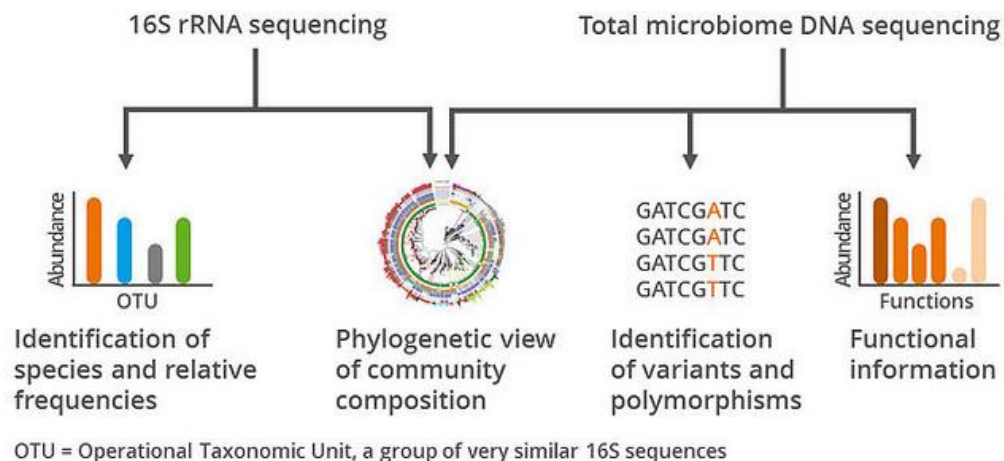
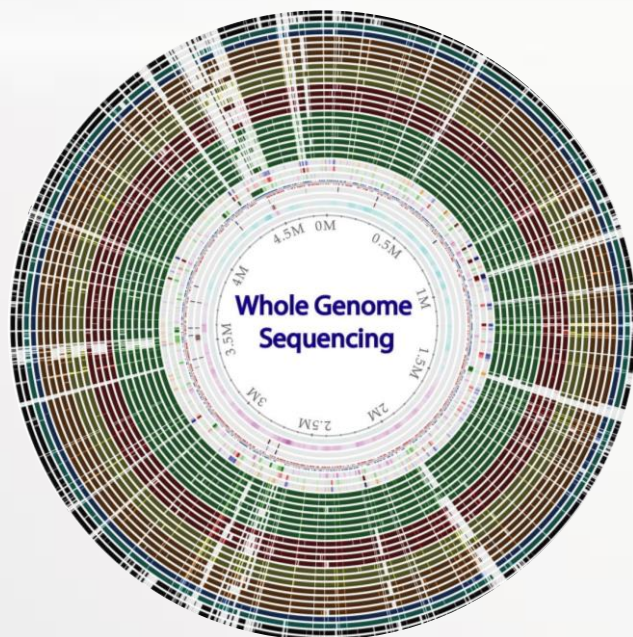


Amplicon clustering



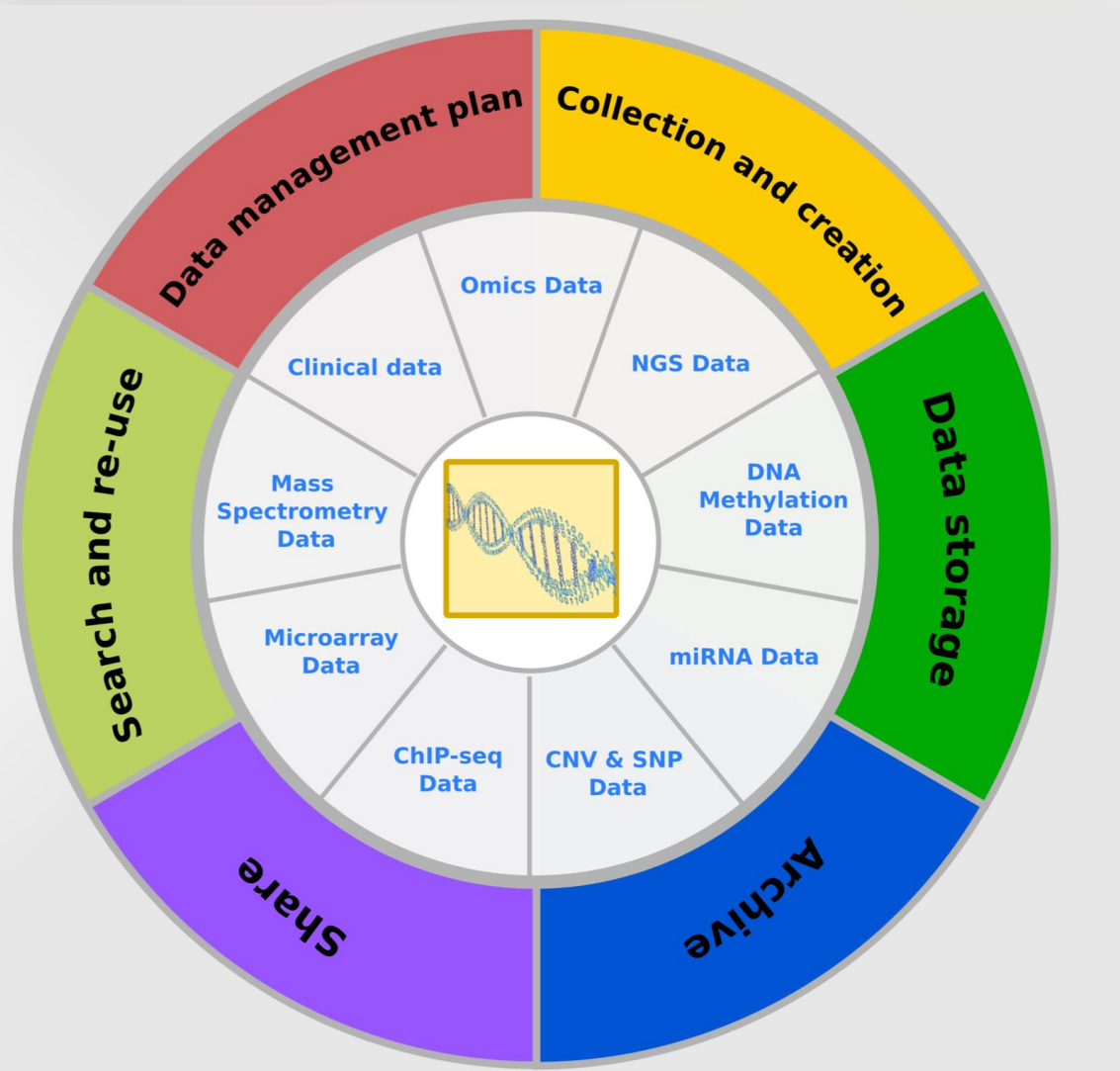
Analisi Interi genomi batterici

- Assembly de novo
- VCF (variant calling file) con reference
- PERSONALIZZATA con reference
 - ✓ MLST, CAPSIDE,
 - ✓ RESistence Finder,
 - ✓ VirulenceFinder,
 - ✓ PlasmidFinder

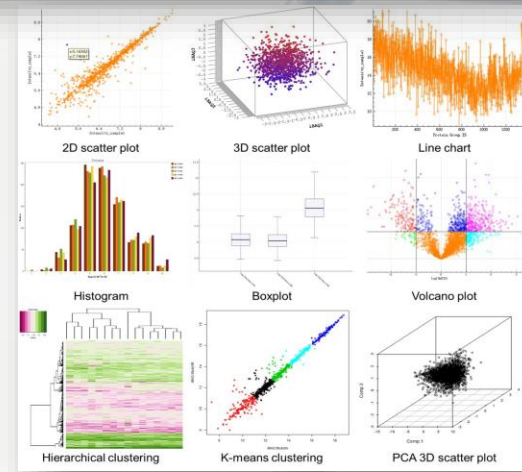


Metagenomica 16s/ITS/18s

- Filtri di qualità (phred score, filtro reads chimeriche, eliminazione reads dell'ospite o altre specie indesiderate)
- Assegnazione tassonomica. Le reads vengono clusterizzate con reference pubblici (RDP, SILVA, Greengenes o richiesti dal cliente)
- Riassunto dei dati in base alla composizione tassonomica
- Distanza filogenetica
- Calcolo della diversità **Alpha** e sua rappresentazione
- Calcolo della diversità **Beta** e sua rappresentazione

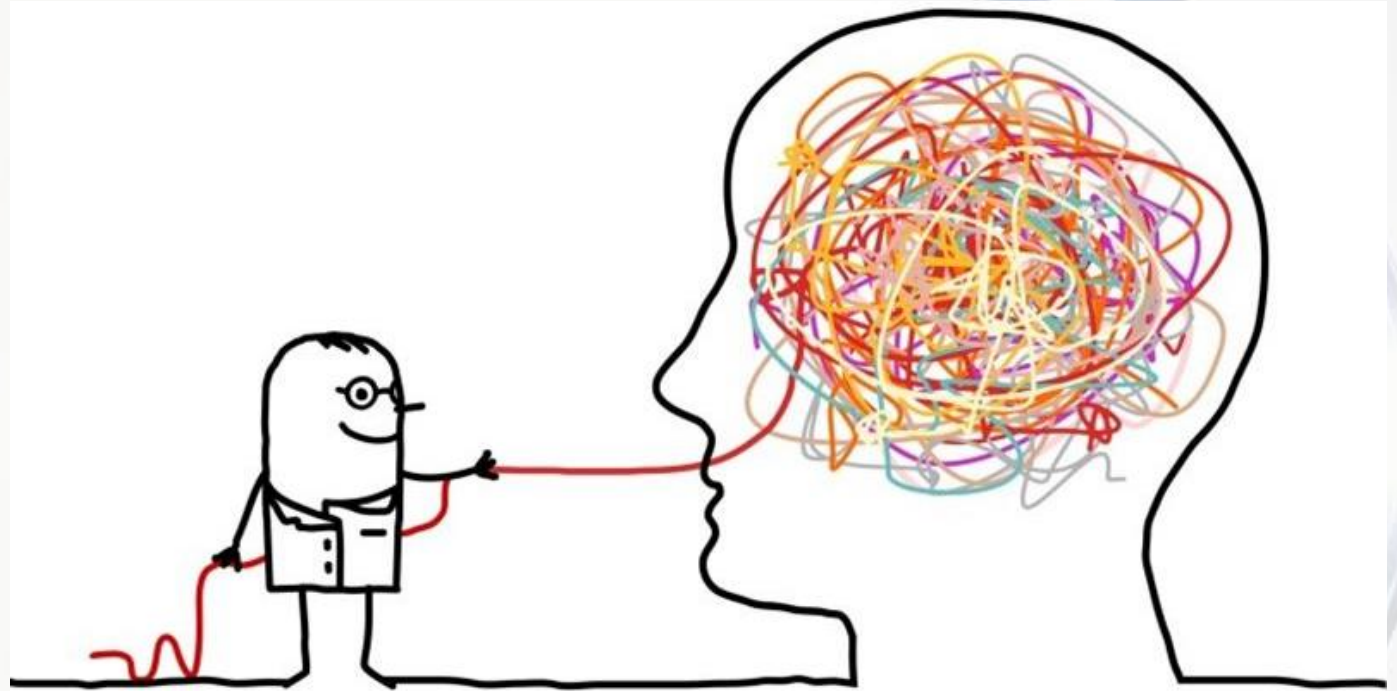


```
>>> from Bio import SeqIO
>>> input = open('0D1_97_10k.fasta', 'rU')
>>> for cur_record in SeqIO.parse(input, 'fasta'):
...     name = cur_record.description
...     A = cur_record.seq.count('A')
...     print name
...     print A
...
BE326250111_2_JLK5VL12 orig_bc=ATCACG new_bc=ATCACG bc_diffs=0
33
BE326250111_37_JLK5VL137 orig_bc=ATCACG new_bc=ATCACG bc_diffs=0
35
BE326250111_54_JLK5VL154 orig_bc=ATCACG new_bc=ATCACG bc_diffs=0
35
BE326250111_91_JLK5VL191 orig_bc=ATCACG new_bc=ATCACG bc_diffs=0
30
BE326250111_90_JLK5VL190 orig_bc=ATCACG new_bc=ATCACG bc_diffs=0
29
BE326250111_127_JLK5VL1127 orig_bc=ATCACG new_bc=ATCACG bc_diffs=0
34
```



The screenshot shows the Galaxy web interface. The 'Edit Attributes' panel is active, displaying fields for Name, Info, Database/Build, and Number of comment lines. The 'Change data type' panel is also visible, with 'tabular' selected as the new type. The interface includes a search bar, a list of tools, and a history panel on the right.

LA NOSTRA
FILOSOFIA PER IL
SUPPORTO DI
ANALISI
BIOINFORMATICA



SERVIZI DI ASSISTENZA BIOINFORMATICA

Bio-Fab offre anche un'ampia gamma di possibilità per personalizzare l'analisi bioinformatica; non solo per i dati elaborati sui nostri sequenziatori, **ma anche su dati grezzi forniti direttamente dal ricercatore.**

- **Servizio standard** Supporto bioinformatico incluso in tutte le pipeline. Viene fornita un'assistenza per la comprensione dei dati.
- **Servizio avanzato** Include la manipolazione personalizzata dei dati e la rappresentazione grafica ad-hoc nel servizio standard, con supporto per la pubblicazione dei dati.
- **Servizio top** Comprende l'assistenza per la progettazione dell'esperimento. Sviluppo di pipeline personalizzate e la valutazione di diverse metodologie per garantire la fornitura di dati affidabili per l'interpretazione biologica

SUPPORTO BIOINFORMATICO

Corsi e seminari

Come posso usare l'NGS per ottimizzare il mio esperimento ed avere risultati più completi?



La Biofab research vuole aiutarti a rispondere a questa domanda!

Vogliamo organizzare un seminario personalizzato per rispondere ai tuoi interrogativi. Partendo dalla tua problematica infatti esploreremo le potenzialità e i limiti nel sequenziamento di nuova generazione: dalla preparazione del campione fino all'interpretazione del dato finale.

Se sei interessato ti invitiamo a sottoporci la tua domanda, bastano poche righe di descrizione....

Le prime tematiche che affronteremo sono sul sequenziamento NGS di piccoli genomi di virus, batteri, metagenomica e ampliconi.

Lets Work Together!

CI VEDIAMO IN LABORATORIO

Edificio 10, piano B, stanza 6

telefono: 064990-3053

E-mail: laboratori@biofabresearch.it