

ФЕДЕРАЛЬНОЕ МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОЕ АГЕНТСТВО  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
НАУКИ  
«НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ФИЗИКО-  
ХИМИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ»  
(ФГБУН НИИ ФХМ ФМБА РОССИИ)

Директор ФГБУН НИИ ФХМ ФМБА России



В.И.Сергиенко

« 29 » ноября 2014 г.

МЕТОДИКА ПРИГОТОВЛЕНИЯ БИБЛИОТЕК ПАРНЫХ ФРАГМЕНТОВ С  
ШАГОМ 1000-10000 ПАР НУКЛЕОТИДОВ, ПРИГОДНЫХ ДЛЯ  
СЕКВЕНИРОВАНИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СЕКВЕНАТОРОВ ВТОРОГО  
ПОКОЛЕНИЯ ION TORENT PGM, ION PROTON

разработана в рамках НИР: «Разработка методик выполнения исследований с использованием высокопроизводительного секвенирования для повышения уровня сложности и расширения перечня выполняемых научно-технических услуг Междисциплинарного ЦКП КФУ»

МОСКВА 2014

## **1. Назначение и область применения**

Настоящая лабораторная методика предназначена для подготовки библиотек парных фрагментов, пригодных для последующего секвенирования с использованием секвенаторов второго поколения Ion Torrent PGM и Ion Proton.

## **2. Принцип методики.**

Методика основана на конструировании фрагментных библиотек, пригодных для секвенирования с использованием секвенаторов второго поколения Ion Torrent PGM и Ion Proton, из исходно более длинных фрагментов геномной ДНК прокариотических и эукариотических организмов. Фрагментация геномной ДНК в диапазоне длин 1000-10000 пар нуклеотидов, направленный отбор фрагментов в более узком диапазоне длин по выбору исследователя, циркуляризация фрагментов с последующей обработкой нуклеазами до длин, пригодных для секвенирования согласно рекомендациям производителя, позволяет эффективно использовать результаты секвенирования подобных библиотек в процедуре скаффолдинга, то есть взаимного расположения контигов при секвенировании геномов *de novo*.

## **3. Оборудование и материалы.**

### **3.1. Оборудование.**

- 3.1.1. Автоматические пипетки Biohit, Финляндия
- 3.1.2. Автоматические пипетки Labmate, HTL Lab Solutions, Польша
- 3.1.3. Источник питания Эльф-4, ДНК-Технология, Россия
- 3.1.4. Настольная центрифуга Combi-Spin FVL-2400N , BioSan, Латвия
- 3.1.5. Настольная центрифуга Mikro 220R, Hettich, Германия
- 3.1.6. Настольная центрифуга Rotina 420, Hettich, Германия
- 3.1.7. Устойство для фрагментации ДНК HydroShear, США
- 3.1.8. Трансиллюминатор SYBR Safe System, Invitrogen, США
- 3.1.9. Флуориметр Qubit 2.0, Invitrogen, США
- 3.1.10. Микрофлюидная система BioAnalyzer 2100, Agilent, США
- 3.1.11. Ультразвуковой дезинтегратор Covaris S2 System (220B), Covaris, США

### **3.2. Материалы.**

- 3.2.1. Набор 5500 SOLiD Mate-Paired Library Kit (Life Technologies, США)
- 3.2.2. Набор Ion Xpress Barcode Adapters 1-16 (Life Technologies, США)
- 3.2.3. Магнитные частицы Angecourt AMPure XP (Beckman Coulter, США)

- 3.2.4. Набор Qubit dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen, США)
- 3.2.5. Набор Qubit dsDNA BR Assay Kit (Invitrogen, США)
- 3.2.6. Пробирки Qubit Assay Tubes (Invitrogen, США)
- 3.2.7. Пробирки LoBind tubes 1,5 мл (Eppendorf, США)
- 3.2.8. Пробирки LoBind tubes 2,0 мл (Eppendorf, США)
- 3.2.9. Набор Agilent High Sensitivity DNA kit (Agilent Technologies, США)
- 3.2.10. Соли и химические реактивы фирмы Sigma (США)
- 3.2.11. Наконечники объемом 10, 100, 200, 1000 мкл с фильтром фирмы SSI (США)
- 3.2.12. Маркер молекулярного веса GeneRuler DNA Ladder Mix (Fermentas, Литва)

#### **4. Методика приготовления библиотек парных фрагментов с шагом 1000-10000 пар нуклеотидов.**

##### **4.1. Фрагментация геномной ДНК.**

Предварительно перед началом процедуры промывают ячейку HydroShear, поместив ее в пробирку, содержащую 1% раствор SDS, до полного освобождения от пузырьков воздуха. Далее пробирку помещают в ультразвуковую ванну и подвергают действию ультразвука в диапазоне 43-45 кГц 15 минут. Ячейку переносят в пробирку с деионизованной водой до полного освобождения от пузырьков воздуха. Далее пробирку помещают в ультразвуковую ванну и подвергают действию ультразвука в диапазоне 43-45 кГц 15 минут. Ячейку переносят в пробирку с изопропанолом до полного освобождения от пузырьков воздуха. Далее пробирку помещают в ультразвуковую ванну и подвергают действию ультразвука в диапазоне 43-45 кГц 15 минут. Ячейку переносят в пробирку с деионизованной водой до полного освобождения от пузырьков воздуха. Далее пробирку помещают в ультразвуковую ванну и подвергают действию ультразвука в диапазоне 43-45 кГц 15 минут.

Предварительно промытую ячейку помещают в прибор, соблюдая правила маркировки согласно инструкции производителя, устанавливают параметры промывки ячейки, нажав кнопку Edit Wash Scheme, а так же параметры фрагментирования согласно следующей таблице:

Диапазон библиотeki	длин	Условия фрагментации	Кол-во ДНК, мкг
1000-2000 пн		SC5 20 cycles	4,5

	Sample volume150	
2000-3000 пн	SC9 20 cycles Sample volume150	5,5
3000-4000 пн	SC13 20 cycles Sample volume150	6,5
4000-5000 пн	SC15 25 cycles Sample volume150	7,5
5000-6000 пн	SC16 25 cycles Sample volume150	8,5

Образец геномной ДНК предварительно готовят, разведя его в необходимом количестве в 170 мкл деионизированной воды. Далее следуют инструкциям, выводимым в режиме реального времени на мониторе подключенного к HydroShear персонального компьютера.

#### 4.2. Отбор фрагментов ДНК в заданном диапазоне длин.

Для осуществления процедуры фракционирования фрагментов ДНК по размеру (size selection) готовят 1% агарозный гель на однократном ТАЕ-буфере (Трис-ацетат 40мМ, ЭДТА 1мМ) с интеркалирующим красителем этидием бромидом. Емкость кармана для нанесения образца составляет 100 мкл. Камеру для электрофореза промывают мягким детергентом, дважды ополаскивают дистиллированной водой и заполняют однократным ТАЕ-буфером (Трис-ацетат 40мМ, ЭДТА 1мМ). Процедуру электрофореза осуществляют при напряженности электрического поля 5 В/см геля. Размер фрагментов ДНК оценивают относительно готового маркера GeneRuler DNA Ladder Mix (Fermentas, Литва)

Критерием полноценной фрагментации исходного образца является полное исчезновение высокомолекулярной фракции, размер фрагментов должен укладываться в требуемый диапазон длин 1000-2000 пн, 2000-3000 пн, 3000-4000 пн, 4000-5000 пн, 5000-6000пн, 6000-10000 пн, с допустимым превышением плюс-минус 500 пар нуклеотидов. ов. Процедуру size selection осуществляют с использованием трансиллюминатора SYBR Safe System (Invitrogen, США), обеспечивающего наиболее щадящий режим визуализации ДНК в агарозном геле. Фрагменты ДНК вырезают из геля с помощью стерильного медицинского скальпеля и помещают в 2 мл пробирки LoBind. Обязательным является

использование защитных очков, входящих в комплект к трансиллюминатору SYBR Safe System.

#### **4.3. Выделение ДНК из агарозного геля.**

1. Кусочек агарозного геля, содержащий фрагменты ДНК, взвешивают, после чего заливают буфером Gel Solubilization buffer (L3) в соотношении 30 мкл буфера на 10 мг агарозы. Пробирку инкубируют при комнатной температуре 10-20 мин с постоянным перемешиванием вплоть до полного растворения агарозы. К образцу добавляют изопропанол в соотношении 10 мкл на 10 мг агарозы и тщательно перемешивают. 650 мкл полученного раствора наносят на сорбирующую колонку и центрифугируют 15 сек при 5000 об/мин, а затем 1 мин при 13000 об/мин. Колонку переносят в чистую пробирку, добавляют 650 мкл 80% этанола и центрифугируют 1 мин при 13000 об/мин. Колонку переносят в чистую пробирку, добавляют 50 мкл буфера E5, инкубируют при комнатной температуре 5 мин и центрифугируют 1 мин при 13000 об/мин. Прошедший через колонку раствор наносят ещё раз на ту же колонку, инкубируют 5 мин при комнатной температуре, после чего повторно центрифугируют 1 мин при 13000 об/мин.

Концентрацию ДНК измеряют с помощью флуориметра Qubit 2.0 (Invitrogen, США) с использованием Quant-iT dsDNA BR Assay Kit (Invitrogen, США). Полученный образец ДНК можно хранить в течение дня при +4 градусах, на более долгий период образец следует заморозить при -20 градусах.

#### **4.4. Конструирование библиотеки парных фрагментов.**

Далее конструирование библиотеки парных фрагментов осуществляют с использованием набора 5500 SOLiD Mate-Paired Library Kit согласно рекомендациям производителя. Очистку ДНК осуществляют с использованием магнитных частиц Angecourt AMPure XP согласно рекомендациям производителя.

На этапе лигирования баркодных адаптеров необходимо заменить рекомендуемые адаптеры на Ion P1 Adapter и Ion Xpress Barcode X из набора Ion Xpress Barcode Adapters 1-16. Далее необходимо провести процедуру предварительной амплификации библиотеки. Для этого необходимо приготовить реакционную смесь, содержащую Platinum PCR Amplification Mix и Ion Library Amplification Mix согласно протоколу производителя пропорционально числу библиотек. В каждую пробирку добавить бусины, связанные с библиотекой. Эффективность предварительной амплификации библиотеки оценивают с помощью электрофореза в 2% агарозном геле, как указано выше, отбирая аликвоты реакционной смеси после каждого второго цикла начиная с десятого. Библиотеку считают

качественной при появлении основного продукта реакции длиной 220 п.н. в промежутке между двенадцатым и восемнадцатым циклами реакции.

Концентрацию ДНК фрагментной готовой библиотеки парных фрагментов определяют с использованием флуориметра Qubit 2.0 (Invitrogen, США) с использованием Quant-iT dsDNA BR Assay Kit (Invitrogen, США). Концентрация амплифицированных фрагментных библиотек должна находиться в интервале от 1 до 30 нг/мкл. Качество фрагментной библиотеки оценивают с использованием микрофлюидного анализатора BioAnalyzer 2100 (Agilent, США) с использованием Agilent DNA 1000 kit (Agilent, США). Основными параметрами для оценки являются размер и форма пика, а так же отсутствие сигнала в области 50-100 пар нуклеотидов. Готовый образец фрагментной библиотеки хранят при -20°C.

#### **5. Список использованных источников и нормативных документов.**

1. Mate-Paired Library Preparation 5500 Series SOLiD Systems. Publication Part Number 4460958 Rev. A. Revision Date March 2011