МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОСИИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
(ФГАОУ ВО КФУ)

Проректор по научной деятельности
ФГАОУ ВО КФУ
_____ Д.К. Нургалиев
«25» _____ 2015 г.

МЕТОДИКА ЭКЗОМНОГО ОБОГАЩЕНИЯ ДНК НА ОСНОВЕ АМПЛИФИКАЦИИ

разработана в рамках Соглашения № 14.594.21.0003 от 15.08.2014 о предоставлении субсидии по теме «Развитие протеогеномного направления Междисциплинарного ЦКП КФУ для обеспечения клеточных, геномных и постгеномных исследований в Приволжском регионе»
(уникальный идентификатор проекта RFMEFI59414X0003)

КАЗАНЬ 2015

1. Назначение и область применения

Настоящая лабораторная методика предназначена для получения множества копий кодирующей части генома человека (экзомов) для последующего анализа с использованием секвенаторов нового поколения IonProton.

2. Принцип методики

Методика основана на использовании набора специфических праймеров и таргетной амплификации кодирующих областей генома человека.

3. Оборудование и материалы

3.1. Оборудование

3.1.1. Автоматические пипетки Eppendorf (Eppendorf, Германия)

3.1.2. Автоматические пипетки Ленпипет (ThermoFisherScientific, США)

3.1.3. Настольная центрифуга Combi-Spin FVL-2400N (Biosan, Латвия)

3.1.4. Настольная центрифуга MiniSpinPlus (Eppendorf, США

3.1.5. АмплификаторVeriti® 96-well Thermal Cycler (Life Technologies, США)

3.1.6. Реал-тайм ПЦР платформа LightCycler® 480 (Roche, Швейцария)

3.1.7. Магнитный сепаратор DynaMag(Life Technologies, США)

3.1.8. Флуориметр Qubit® 2.0 Fluorometer(Life Technologies, США)

3.1.9. Микрофлюидная система Agilent® 2100 Bioanalyzer® (Agilent Technologies, США)

3.1.10. Вакуумный концентратор Eppendorf Concentrator plus (Eppendorf, Германия)

3.1.11. Штатив для магнитной сепарации DynaMag-2 Magnet (Life Technologies, США)

3.1.12. Термостат Термит (ДНК-технология, Россия)

3.1.13. Спектрофотометр Nano Drop 2000 (Thermo Scientific, США)

3.2. Материалы

3.2.1. Набор реагентов Ion AmpliSeq Library Kit (Life Technologies,США)

3.2.2. Набор праймеров в формате плашки для ПЦР Ion AmpliSeq Exome RDY Panels (Life Technologies, Швейцария)

3.2.3. Чипы для секвенирования Ion PI Chip Kit v2 (Life Technologies, США)

3.2.4. Пленка MicroAmp® Clear Adhesive Film (Life Technologies, США)

3.2.5. Плашка LightCycler® 480 Multiwell Plate 96 (Roche, Швейцария)

3.2.6. Реакционная смесь LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche, Швейцария)

3.2.7. Магнитные частицы Agencourt® AMPure® XP Kit (Beckman Coulter)

3.2.8. Деионизированная вода без нуклеазной активности Nuclease-free water (LifeTechnologies, США)

3.2.9. Набор QubitiTdsDNA HS Assay Kit (Invitrogen, США)

3.2.10. Набор QubitiTdsDNA BR Assay Kit (Invitrogen, США)

3.2.11. Набор Agilent® DNA 1000 Kit (Agilent Technologies, США)

3.2.12. Пробирки Qubit Assay Tubes (Invitrogen, США)

3.2.13. Пробирки LoBind tubes 1,5 мл (Eppendorf, Германия)

3.2.14. Пробирки 0,2 мл PCR-tube (Eppendorf, Германия)

3.2.15. Наконечники объемом 10, 100, 200, 1000 мкл с фильтром OmniTip (ULPlast,Польша)

3.2.16. Маркер молекулярного веса100 bp + 1.5 Kb (Сибэнзим, Россия)

3.2.17. Интеркалирующий краситель GelRed (Biotium, США)

3.2.18. Химические реактивы Sigma (США)

4. Методика экзомного обогащения ДНК человека на основе амплификации

4.1. Таргетное обогащение кодирующих регионов генома методом ПЦР

Для амплификации целевых регионов требуется 50-100 нг не деградированной геномной ДНК в объеме 56 мкл. Концентрацию ДНК рекомендуется оценивать с помощью флуориметра Qubit (Invitrogen, США). К 56 мкл геномной ДНК добавляют 14 мкл готовой реакционной смеси Ion Ampliseq HiFi Mix, аккуратно перемешивают и раскапывают по 5 мкл в 12 лунок плашки, в которых находятся высушенные праймеры для обогащения. Процесс амплификации осуществляют при следующих параметрах:

99°C - 2 минуты,

10 циклов:

99°C - 15 секунд,

60°C - 16 минут.

По окончании амплификации сбрасывают капли путем кратковременного центрифугирования плашки. Продукты амплификации из 12 лунок объединяют и проводят дальнейшие манипуляции в 0.2 мл PCR grade пробирке.

4.2. Подготовка экзомной библиотеки для секвенирования. Лигирование адаптеров и баркодов.

Осуществляют частичное расщепление последовательностей праймеров путем добавления 6 мкл FuPa реагента, перемешивают пипетированием и инкубируют в амплификаторе при следующих параметрах: 50°C - 10 минут, 55°C - 10 минут, 60°C - 20 минут. Далее осуществляют лигирование адапторов. Для каждого баркода готовят микс из Ion P1 Adapter и Ion Xpress Barcode с конечным разведением 1:4. К реакционной смеси добавляют 12 мкл раствора Switch Solution, затем 6 мкл ДНК-лигазы и 6 мкл смеси адаптеров. Полученный микс инкубируют в амплификаторепри следующих параметрах: 22°C - 30 минут, 72°C - 10 минут. Далее проводят очистку полученной библиотеки с пришитыми адапторами с помощью магнитных частиц AMPure beads. В реакционную смесь добавляют 1 объем магнитных частиц, тщательно перемешиват на вортексе и икубируют при комнатной температуре в течение 5 минут. Затем переносят на магнитный штатив и осуществляют двухкратную промывку частиц со связанной библиотекой 70% этанолом. После сушки в течении 5 минут при комнатной температуры ДНК элюируют 50 мкл деионизированной воды DNAse free water.

4.3. Оценка качества экзомной библиотеки

Оценку качесва библиотеки осуществляют с плмощью прибора Agilent 2100 Bioanalyzer с использованием чипа Agilent Bioanalyzer DNA High Sensitivity chip. Библиотека считается качественной, если фрагменты ДНК находятся в диапазоне длин от 150 до 500 пар нуклеотидов.

Количественную оценку осуществляют с пощью ПЦР в реальном времени. Для этого готовят 100-кратное разведние очищенной библиотеки и серию 10-кратных разведений стандаратов - контрольной библиотеки E. coli DH10B с конечными концентрациями в 6.8 pM, 0.68 pM и 0.068 pM. Для стандартов и обогащенной библиотеки готовет реакционную смесь из 20 мкл 2x TaqMan Master Mix и 2 мкл 20x Ion TaqMan Assay. 11 мкл полученной смеси добавляют к 9 мклразведенной ДНК и осуществляют процесс аплификации в реальном времени при следующих параметрах:

95°C 20 sec

40 циклов:

95°C 1 sec

60°C 20 sec

По окончании амплификации осуществляю расчет концентрации библиотеки, учитывая 100-кратное разведение обогащенной библиотеки.