

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 »

коздря

2014 г.



МЕТОДИКА НОРМАЛИЗАЦИИ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ БИБЛИОТЕК,
ПРИГОДНЫХ ДЛЯ СЕКВЕНИРОВАНИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
СЕКВЕНАТОРОВ ВТОРОГО ПОКОЛЕНИЯ

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 нормализации транскриптомных библиотек, пригодных для последующего секвенирования с использованием секвенаторов второго поколения.

2. Принцип методики.

Методика основана на принципе ДНК-ДНК гибридизации, что позволяет уменьшать относительную представленность транскриптов активно экспрессирующихся генов, и в том числе генов рибосомальной РНК, в пользу низкокопийных транскриптов.

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. Амплификатор Bio-Rad Tetrad 2, Bio-Rad, 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. Магнитный штатив DynaMag2, Invitrogen, США

3.2. Материалы.

- 3.2.1. Наконечники объемом 10, 100, 200, 1000 мкл с фильтром фирмы SSI (США)
- 3.2.2. Соли и химические реактивы фирмы Sigma (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. High Fidelity PCR Enzyme Mix (Fermentas, Литва)
- 3.2.11. Маркер молекулярного веса GeneRuler DNA Ladder Mix (Fermentas, Литва)

- 3.2.12. Набор Quant-iT™ RNA Assay Kit, 5–100 ng (Invitrogen, США)
- 3.2.13. Набор Agilent RNA 6000 Pico kit (Agilent Technologies, США)
- 3.2.14. Набор SOLiD TM Total RNA-Seq Kit (Ambion, США)
- 3.2.15. Набор SOLiD® RNA Barcoding Kit (Ambion, США)
- 3.2.16. Duplex-specific nuclease (lyophilized) (ЕвроГен, Россия)

4. Методика нормализации транскрипционных библиотек, пригодных для секвенирования с использованием секвенаторов второго поколения.

4.1. Приготовление транскриптомной библиотеки.

Предварительно точную оценку количества тотальной РНК в образце осуществляют с использованием набора «Quant-iT™ RNA Assay Kit, 5–100 ng» на флуориметре Qubit 2.0 (Invitrogen, США). Оценку качества препарата тотальной РНК осуществляют с помощью набора «Agilent RNA 6000 Pico kit» на капиллярном анализаторе Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, США). При этом качество препарата тотальной РНК признают достаточным при значении показателя RIN от 8 единиц.

Транскриптомную библиотеку готовят с использованием набора SOLiD TM Total RNA-Seq Kit (Ambion) и набора для баркодирования SOLiD® RNA Barcoding Kit (Ambion) согласно рекомендациям производителя из 500 нг образца тотальной РНК в трех повторах.

Точную оценку количества полученных транскриптомных библиотек тотальной РНК осуществляют с использованием набора QuantIt ds DNA HS Assay kit 0.2-100ng на флуориметре Qubit 2.0 (Invitrogen, США). Оценку качества препаратов транскриптомных библиотек тотальной РНК осуществляют с помощью набора Agilent High Sensitivity DNA kit на капиллярном анализаторе Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, США). Концентрация библиотек должна составлять не менее 5 нг/мкл. Качество препаратов признается высоким на основании присутствия четкого пика в диапазоне длин 200-300 пар нуклеотидов и отсутствия шумов в низкомолекулярной области, соответствующей размерам димеров адаптеров, использованных для создания библиотек.

4.2. Приготовление раствора дуплекс-специфической нуклеазы.

Нормализацию транскриптомной библиотеки осуществляют с использованием фермента дуплекс-специфической нуклеазы Duplex-specific nuclease (lyophilized) (ЕвроГен, Россия). Предварительно готовят рабочий раствор фермента. Для этого лиофилизированный фермент растворяют в специфическом буфере из расчета 5 мкл

буфера на 10 единиц фермента. Раствор перемешивают, аккуратно переворачивая пробирку несколько раз, после чего инкубируют при комнатной температуре 5 мин. К раствору добавляют 100% глицерин до конечной концентрации 50% от объема, перемешивают, аккуратно переворачивая пробирку несколько раз, после чего хранят при 20°C до использования.

Перед использованием оценивают активность раствора дуплекс-специфической нуклеазы. Для этого готовят реакционную смесь из 12 мкл воды, свободной от нуклеаз, 4 мкл контрольной ДНК и 2 мкл специального буфера, которую затем поровну делят на две аликовты. К первой в качестве отрицательного контроля добавляют 1 мкл воды, свободной от нуклеаз, ко второй – 1 мкл рабочего раствора дуплекс-специфической нуклеазы, приготовленного ранее. Пробирки инкубируют в программируемом амплификаторе при 65°C 10 мин. Далее дуплекс-специфическую нуклеазу инактивируют добавлением специфического стоп-раствора, входящего в состав набора.

Активность раствора дуплекс-специфической нуклеазы оценивают посредством электрофореза в агарозном геле. Для этого готовят 1,5% агарозный гель на однократном ТАЕ-буфере (Трис-ацетат 40мМ, ЭДТА 1мМ) с интеркалирующим красителем этидием бромидом. Емкость кармана для нанесения образца составляет 10 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). Активность фермента считается достаточной, если яркость полос ДНК в отрицательном контроле значительно преобладает над яркостью в опытном образце, вплоть до полного исчезновения четких полос.

4.3. Нормализация транскриптомной библиотеки.

Нормализацию транскриптомной библиотеки осуществляют с использованием готового раствора дуплекс-специфической нуклеазы в объеме 10 мкл. Реакционная смесь содержит 5 мкл исходной транскриптомной библиотеки, 3 мкл воды, свободной от нуклеаз, 1 мкл специализированного буфера и 1 мкл рабочего раствора дуплекс-специфической нуклеазы. Содержимое пробирки тщательно пипетируют и пробирку инкубируют в программируемом амплификаторе при 65°C 20 мин. Далее дуплекс-специфическую нуклеазу инактивируют добавлением 5 мкл специфического стоп-раствора, входящего в состав набора.

Содержимое пробирки подвергают очистке с использованием магнитных частиц Angecourt AMPure XP. Предварительно суспензию магнитных частиц тщательно перемешивают и согревают до комнатной температуры. В каждую пробирку добавляют Добавить 60 мкл частиц, тщательно перемешивают пипетированием и инкубируют 5 мин при комнатной температуре. Помещают пробирки в магнитный штатив на 2 минуты до полного осветления раствора. Аккуратно отбирают жидкость, не касаясь скопления магнитных частиц на стенке пробирки. Добавляют в пробирки 600 мкл свежеприготовленного 70% этанола, инкубируют 30 секунд, после чего аккуратно отбирают жидкость, не касаясь скопления магнитных частиц на стенке пробирки. Повторно добавляют в пробирки 600 мкл свежеприготовленного 70% этанола, инкубируют 30 секунд, после чего аккуратно отбирают жидкость, не касаясь скопления магнитных частиц на стенке пробирки. Тщательно удаляют наконечником пипетки оставшиеся капли этанола, после чего просушивают магнитные частицы на воздухе в течение 10 мин, не извлекая пробирки из магнитного штатива. Далее в каждую пробирку добавляют 52 мкл раствора 10 mM Трис pH 8,5, перемешивают на вортексе и вновь помещают в магнитный штатив на 2 минуты до полного осветления раствора. Раствор ДНК переносят в свежую LoBind-пробирку.

Далее осуществляют амплификацию образца в реакционной смеси, содержащей 10X ПЦР-буфер 5 мкл, смесь 2,5 mM дNTP 4 мкл, SOLiD 5' PCR Primer 1 мкл, AmpliTaq DNA Polimerase 0,5 мкл, раствор очищенной транскриптомной библиотеки 5 мкл и воду, свободную от нуклеаз 36,5 мкл. Полимеразную цепную реакцию осуществляют при следующих условиях:

95°C 5 минуты – 1 цикл;

95°C 30 секунд

62°C 30 секунд - 15 циклов;

72°C 30 секунд

72°C 7 минут – 1 цикл.

Точную оценку количества полученной транскриптомной библиотеки тотальной РНК осуществляют с использованием набора QuantIt ds DNA HS Assay kit 0.2-100ng на флуориметре Qubit 2.0 (Invitrogen, США). Оценку качества препаратов транскриптомных библиотеки тотальной РНК осуществляют с помощью набора Agilent High Sensitivity DNA

kit на капиллярном анализаторе Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, США). Концентрация библиотек должна составлять не менее 0,5 нг/мкл.

Далее процедуру нормализации повторяют второй раз, как описано выше. Нормализованный образец подвергают очистке с использованием магнитных частиц Angecourt AMPure XP и повторно амплифицируют, как описано выше. Оценку количества и качества нормализованной транскриптомной библиотеки осуществляют с использованием набора QuantIt ds DNA HS Assay kit 0.2-100ng на флуориметре Qubit 2.0 (Invitrogen, США). Оценку качества транскриптомных библиотеки тотальной РНК осуществляют с помощью набора Agilent High Sensitivity DNA kit на капиллярном анализаторе Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, США). Концентрация библиотек должна составлять не менее 0,5 нг/мкл. Качество библиотеки признается высоким на основании присутствия четкого пика в диапазоне длин 200-300 пар нуклеотидов и отсутствия шумов в низкомолекулярной области, соответствующей размерам димеров адаптеров, использованных для создания библиотек

5. Список использованных источников и нормативных документов.

1. SOLiD Total RNA-Seq Kit? 4452437 RevB
2. Duplex-specific nuclease, Евроген, инструкция к использованию.