

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 »  2014 г.

МЕТОДИКА МЕТАГЕНОМНОГО АНАЛИЗА ПРИРОДНЫХ СООБЩЕСТВ
НА ОСНОВЕ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО 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»

1. Назначение и область применения

Настоящая лабораторная методика предназначена для анализа таксономического и функционального анализа природных сообществ микроорганизмов с использованием секвенаторов второго поколения SOLiD4.

2. Принцип методики.

Методика основана на технологии секвенирования библиотек фрагментов ДНК, приготовленных из образцов, выделенных из природных сообществ микроорганизмов. Таксономическая и функциональная реконструкция сообщества осуществляется посредством выравнивания коротких прочтений на референсный каталог генов и геномов бактерий.

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
- 3.1.12. Ультразвуковой дезинтегратор Covaris S2 System (220B), Covaris, США
- 3.1.13. Миксер SOLiD EZ Bead Emulsifier, Applied Biosystems, США
- 3.1.14. Амплификатор SOLiD EZ Bead Amplifier, Applied Biosystems, США
- 3.1.15. Обоганитель SOLiD EZ Bead Enricher, Applied Biosystems, США
- 3.1.16. Генетический анализатор SOLiD 4 Analyzer, Applied Biosystems, 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. Маркер молекулярного веса GeneRuler DNA Ladder Mix (Fermentas, Литва)
- 3.2.11. Пробирки Micro Tube (6x16 mm), AFA Fiber with Snap-Cap (Covaris, США)
- 3.2.12. Набор SOLiD Fragment Library Construction Reagents (Applied Biosystems, США)
- 3.2.13. Набор SOLiD Library Column Purification Kit (Applied Biosystems, США)
- 3.2.14. Набор SOLiD™ EZ Bead™ E80 System Consumables (Applied Biosystems, США)
- 3.2.15. Набор SOLiD™ PreDeposition Kit (Applied Biosystems, США)
- 3.2.16. Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (Fermentas, Литва)
- 3.2.17. Набор SOLiD™ ToP Sequencing Kit, MM50 (Applied Biosystems, США)
- 3.2.18. Набор SOLiD™ ToP Instrument Buffer Kit (Applied Biosystems, США)

4. Методика метагеномного анализа природных сообществ на основе высокопроизводительного секвенирования с использованием секвенаторов второго поколения.

4.1. Конструирование фрагментных библиотек для секвенирования с использованием генетического анализатора SOLiD 4.

Фрагментирование ДНК осуществляют с использованием ультразвукового дезинтегратора Covaris S2 System. Перед включением прибора заполняют резервуар свежей деионизованной водой. Прибор включают на охлаждение до 5°C и дегазацию не менее чем за 30 минут до начала процедуры фрагментирования ДНК. В пробирки Micro Tube (6x16 mm), AFA Fiber with Snap-Cap добавляют 100 мкл образца, содержащего 2 мкг ДНК в ТЕ-буфере, избегая образования пузырей. Пробирку закрепляют в фиксаторе и подвергают воздействию ультразвука при следующих параметрах: количество циклов 6, режим Frequency sweeping, мощность 10%, интенсивность 5, время воздействия 60 секунд. После завершения процесса фиксатор вынимают из прибора, пробирку аккуратно извлекают и переносят образец ДНК в 1,5 мл LoBind пробирку. Фрагментированную ДНК хранят при 4°C в течение дня либо замораживают и хранят при -20°C.

Для отбора фрагментов ДНК по размеру в заданном диапазоне длин готовят 2% агарозный гель на однократном TAE-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 TAE-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

Критерием полноценной фрагментации исходного образца является полное исчезновение высокомолекулярной фракции, размер фрагментов должен укладываться в диапазон от 50 до 500 пар нуклеотидов с преобладанием в области 100-200 пар нуклеотидов. Процедуру size selection осуществляют с использованием трансиллюминатора SYBR Safe System, обеспечивающего наиболее щадящий режим визуализации ДНК в агарозном геле. Фрагменты ДНК в диапазоне длин 100-200 пар нуклеотидов вырезают из геля с помощью стерильного медицинского скальпеля. Обязательным является использование защитных очков, входящих в комплект к трансиллюминатору SYBR Safe System. Последующую процедуру выделения фрагментов ДНК из агарозного геля осуществляют согласно инструкции производителя. Концентрацию ДНК измеряют с помощью флуориметра Qubit 2.0 (Invitrogen, США) с использованием Quant-iT dsDNA BR Assay Kit (Invitrogen, США). На данном этапе концентрация ДНК должна находиться в диапазоне от 5 до 50 нг/мкл.

Далее процедуру подготовки библиотеки осуществляют с использованием набора наборов SOLiD Fragment Library Construction Reagents (Applied Biosystems, США) и SOLiD Library Column Purification Kit (Applied Biosystems, США) согласно инструкции производителя со некоторыми модификациями. Реакцию затупления концов проводят в объеме реакционной смеси в два раза меньшем, чем указано в инструкции. На всех этапах процесса эффективность процедуры контролируют измерением концентрации ДНК с использованием флуориметра Qubit 2.0 (Invitrogen, США). 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 шестого. Библиотеку считают качественной при появлении основного продукта реакции длиной 220 п.н. в промежутке между шестым и двенадцатым циклами реакции.

Концентрацию ДНК фрагментной библиотеки 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.

4.2. Клональная амплификация фрагментной библиотеки.

Процедуру клональной амплификации библиотеки осуществляют с использованием миксера SOLiD EZ Bead Emulsifier, амплификатора SOLiD EZ Bead Amplifier, обогатителя SOLiD EZ Bead Enricher и набора SOLiD TM EZ Bead TM E80 System Consumables (Applied Biosystems, США), согласно рекомендациям производителя. Разведение исходной библиотеки до рабочей концентрации осуществляют путем серии разведений, избегая отбора объемов менее чем 3 мкл. Концентрацию конечного разведения измеряют с применением флуориметра Qubit 2.0 (Invitrogen, США) с использованием Quant-iT dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen, США). Расчет количества библиотеки, необходимого для постановки эмульсионной ПЦР, осуществляют с использованием рекомендованной производителем программы-калькулятора и увеличивают полученное значение на 50% относительно рекомендованного. Рабочее разведение исходной библиотеки готовят непосредственно перед использованием.

Процедуру 3'-модификации осуществляют с использованием набора PreDeposition Kit согласно рекомендации производителя. Вместо фермента, входящего в набор, используют Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (Fermentas, Литва). Реакцию проводят при 37°C и постоянном перемешивании в течение 15 часов.

4.3. Предварительный прогон для оценки качества бусин.

Процедуру предварительного прогона для оценки качества бусин осуществляют с использованием генетического анализатора SOLiD4 и наборов SOLiD™ ToP Sequencing Kit, MM50 и SOLiD TM ToP Instrument Buffer Kit согласно инструкциям производителя.

Предварительный подсчет количества бусин, полученных после 3'-модификации, осуществляют в камере Горяева с использованием стандартного микроскопа.

Аликвоту суспензии бусин перед помещением в магнитный штатив разбавляют ТЕХ-буфером до объема 100 мкл.

Оценку качества препарата осуществляют на основании параметров N2S (среднее соотношение шума и флуоресцентного сигнала в образце), P2/P1 (процент обогащенных бусин), On axis (присутствие в образце поликлональных бусин) и Titration metric (интегральная характеристика образца). Образец обогащенных бусин считают качественным при достижении следующих параметров по результатам предварительного прогона: $N2S \leq 9$, $P2/P1 \geq 80\%$, $On\ axis \geq 80\%$, $Titration\ metric \geq 70\%$

4.4. Процедура высокопроизводительного секвенирования образцов.

Секвенирование фрагментных библиотек с использованием генетического анализатора SOLiD4 осуществляют в формате полного слайда с использованием наборов SOLiD™ ToP Sequencing Kit, MM50 и SOLiD™ ToP Instrument Buffer Kit согласно инструкциям производителя.

Расчет объема суспензии бусин, необходимого для нанесения на слайд, осуществляют по формуле, рекомендованной производителем. Расчетный объем увеличивают на 30% относительно рекомендованного для полного слайда.

Перед отбором объема, необходимого для нанесения на слайд, исходную суспензию бусин трижды подвергают воздействию ультразвуком с использованием Covaris S2 System (Covaris, США) по программе «Covalent Declump 3».

Из протокола исключают процедуру предварительной обработки стекла для нанесения образца раствором перекиси водорода.

После нанесения бусин на слайд его выдерживают 10 минут при комнатной температуре, после чего инкубируют два часа при 37°C, центрифугируя в плашечной центрифуге при 300 оборотов каждые 30 минут.

Подготовленный слайд помещают в генетический анализатор SOLiD 4 для осуществления процедуры секвенирования. Мониторинг процедуры и оценку качества полученных результатов осуществляют на основании параметров «Количество рабочих бусин» ≥ 450000000 штук, «Количество идеальных бусин» $\geq 20\%$ от количества рабочих бусин, «Экспозиция» «Количество используемых панелей» $\geq 95\%$ от возможного.

4.5. Таксономическая и функциональная реконструкция природного микробного сообщества.

Предварительная обработка геномных данных включает в себя отбрасывание низкокачественных прочтений, коррекцию с помощью программы SAET и обрезание по качеству. Таксономический состав микробиоты реконструируется в результате картирования прочтений на избыточный референсный каталог из репрезентативных геномов микроорганизмов, соответствующих источнику анализируемого образца, с использованием программного пакета Bowtie. Относительная представленность генома в образце рассчитывается путем деления общей длины прочтений, картировавшихся на геном, на длину генома, с последующей нормировкой на общую длину прочтений, откартировавшихся на все геномы для данного образца. Функциональный состав микробиоты так же реконструируется в результате картирования прочтений на избыточный референсный каталог из репрезентативных геномов микроорганизмов, соответствующих источнику анализируемого образца, с использованием программного пакета Bowtie. Относительная представленность гена в образце рассчитывается путем деления общей длины прочтений, картировавшихся на ген, на длину гена, с последующей нормировкой на общую длину прочтений, откартировавшихся на все гены для данного образца. Статистический анализ и визуализация осуществляются в пакете R. Расстояние между образцами вычисляется по метрике Bray-Curtis. Иерархическая кластеризация осуществляется по методу Варда. Нормально распределенные величины сравниваются с помощью теста t-тестов Стьюдента и Уэлча, ненормальные – Вилкоксона. Поправка на множественные сравнения производится с помощью FDR.

5. Список использованных источников и нормативных документов.

1. Applied Biosystems SOLiD™ 4 System Library Preparation Guide, Part Number 4445673, Rev. A 03/2010
2. SOLiD™ EZ Bead™ Emulsifier, Part Number 4441486, Rev. 01 05/2010
3. SOLiD™ EZ Bead™ Amplifier, Part Number 4443494, Rev. 01 05/2010
4. SOLiD™ EZ Bead™ Enricher, Part Number 4443496, Rev. 01 05/2010
5. Applied Biosystems SOLiD™ 4 System Instrument Operation Guide, Part Number 4448379, Rev. A 03/2010
6. Langmead B., Trapnell C., Pop M., Salzberg S.L. (2009) *Genome Biol.*, **10**, R25.
7. R Development Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing R Foundation for Statistical Computing (2010). Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.