

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



« 28 »

кодоря

2014 г.

МЕТОДИКА СЕКВЕНИРОВАНИЯ ТЕМАТИЧЕСКИХ АМПЛИКОНОВ 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 подготовки тематических библиотек ампликонов, пригодных для последующего секвенирования с использованием секвенаторов второго поколения Ion Torrent PGM и Ion Proton.

2. Принцип методики.

Методика основана на методе полимеразной цепной реакции, позволяющей конструировать библиотеки ампликонов, пригодных для секвенирования с использованием секвенаторов второго поколения Ion Torrent PGM и Ion Proton с использованием праймеров, синтезированных по индивидуальному дизайну.

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. Ion OneTouch 2 System, Life Technologies, США
- 3.1.13. Ion Torrent PGM, Life Technologies, 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 реагенты 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 Ion PGM™ Template OT2 400 Kit (Life Technologies, США)
- 3.2.13. Набор Ion PGM™ Sequencing 400 Kit (Life Technologies, США)
- 3.2.14. Ion 314™ Chip Kit v2 (Life Technologies, США)
- 3.2.15. Магнитные частицы Dynabeads® MyOne C1 (Invitrogen, США)
- 3.2.16. Ion Sphere Quality Control assay (Life Technologies, США)

3.3. Синтетические олигонуклеотиды НПФ "ЛИТЕХ", Россия.

27 agagttgatcctggctcag
534 attaccgcggctgtgg
357 cctacgggaggcagcag
926 ccgtcaattcmtttragt
27F ccaactacgcctccgttccctctatggcagtcggatagagttgatcctggctcag
534R1 ccatctcatccctgcgtgtccgactcagtaaggtaacgatattaccgcggctgtgg
534R2 ccatctcatccctgcgtgtccgactcagtaaggagaacgatattaccgcggctgtgg
534R3 ccatctcatccctgcgtgtccgactcagaagaggattcgatattaccgcggctgtgg
534R4 ccatctcatccctgcgtgtccgactcagtgatattaccgcggctgtgg
357F ccaactacgcctccgttccctctatggcagtcggatcctacgggaggcagcag
926R1 ccatctcatccctgcgtgtccgactcagtaaggtaacgatccgtcaattcmtttragt
926R2 ccatctcatccctgcgtgtccgactcagtaaggagaacgatccgtcaattcmtttragt
926R3 ccatctcatccctgcgtgtccgactcagaagaggattcgatccgtcaattcmtttragt
926R4 ccatctcatccctgcgtgtccgactcagtgatccgtcaattcmtttragt

4. Методика секвенирования тематических ампликонов с использованием секвенирования с использованием секвенаторов второго поколения.

4.1. Приготовление библиотек ампликонов.

Концентрацию ДНК в анализируемом образце определяют с помощью флуориметра Qubit 2.0 (Invitrogen, США) с использованием Quant-iT dsDNA BR Assay Kit (Invitrogen, США) и разводят образец до концентрации 10 нг/мкл.

Стоковые растворы праймеров разводят до рабочей концентрации 5 пмоль/мкл.

Первичную амплификацию образца осуществляют с использованием High Fidelity PCR Enzyme Mix. Готовят реакционную смесь, содержащую 10X High Fidelity PCR buffer with 15 mM MgCl₂ – 40 мкл, dNTP Mix – 40 мкл, High Fidelity PCR Enzyme Mix – 8 мкл, воду, свободную от нуклеаз – 84 мкл. Полученную смесь тщательно перемешивают на

вортексе, сбрасывают капли коротким центрифугированием и разделяют на аликовты по 43 мкл. Пробирки с аликовтами реакционной смесью маркируют цифрами 1, 2, 3, 4. В пробирки 1 и 2 добавляют по 1 мкл рабочих растворов праймеров 27 и 534, в пробирки 3 и 4 добавляют по 1 мкл рабочих растворов праймеров 357 и 926. Далее в пробирки 1 и 3 добавляют по 5 мкл воды, свободной от нуклеаз, а в пробирки 2 и 4 – по 5 мкл разведенного образца ДНК. Полученные смеси тщательно перемешивают на вортексе, сбрасывают капли коротким центрифугированием, пробирки помещают в амплификатор. Полимеразную цепную реакцию осуществляют при следующих условиях:

95°C 3 минуты – 1 цикл;

95°C 30 секунд

55°C 30 секунд - 25 циклов;

72°C 30 секунд

72°C 10 минут – 1 цикл.

Эффективность полимеразной цепной реакции оценивают посредством электрофореза в агарозном геле. Для этого используют 2% агарозный гель на однократном ТАЕ-буфере (Трис-ацетат 40мМ, ЭДТА 1мМ) с интеркалирующим красителем этидием бромидом. Емкость кармана для нанесения образца составляет 50 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). При наличии четких полос в области диапазона длин 600 пн для пробирки 2 и 550 пн для пробирки 4, а так же отсутствия полос для пробирок 1 и 3 (отрицательный контроль) амплификацию целевого образца считают успешной. допускается присутствие димеров адаптеров в диапазоне длин 60-100 пн.

Содержимое пробирок 2 и 4 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 40 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 400 мкл свежеприготовленного 70% этанола, инкубируют 30 секунд, после чего аккуратно отбирают жидкость, не касаясь скопления магнитных частиц на стенке пробирки. Повторно добавляют в пробирки 400 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 и используют для второго раунда амплификации.

Вторичную амплификацию образца осуществляют с использованием High Fidelity PCR Enzyme Mix, как описано ранее. Готовят реакционную смесь, содержащую 10X High Fidelity PCR buffer with 15 mM MgCl₂ – 80 мкл, dNTP Mix – 80 мкл, High Fidelity PCR Enzyme Mix – 16 мкл, воду, свободную от нуклеаз – 168 мкл. Полученную смесь тщательно перемешивают на вортексе, сбрасывают капли коротким центрифугированием и разделяют на аликовты по 43 мкл. Пробирки с аликовтами реакционной смеси маркируют цифрами от 1 до 8. В пробирки 1 - 4 добавляют по 1 мкл рабочего раствора праймера 27A, в пробирки 5 - 8 добавляют по 1 мкл рабочего раствора праймера 357. Далее в каждую из пробирок 1 - 4 добавляют по 1 мкл рабочего раствора праймеров 534R1- 534R4, соответственно, в каждую из пробирок 5 - 8 добавляют по 1 мкл рабочего раствора праймеров 926R1- 926R4, соответственно. Далее в пробирки 1 - 4 добавляют добавляют по 5 мкл очищенного образца ДНК из пробирки 2 после первичной амплификации, а в пробирки 5 - 8 добавляют добавляют по 5 мкл очищенного образца ДНК из пробирки 4 после первичной амплификации. Полученные смеси тщательно перемешивают на вортексе, сбрасывают капли коротким центрифугированием, пробирки помещают в амплификатор. Полимеразную цепную реакцию осуществляют при следующих условиях:

95°C 3 минуты – 1 цикл;

95°C 30 секунд

55°C 30 секунд - 8 циклов;

72°C 30 секунд

72°C 10 минут – 1 цикл.

Эффективность полимеразной цепной реакции оценивают посредством электрофореза в агарозном геле, как описано выше. Содержимое пробирок после амплификации подвергают очистке с использованием магнитных частиц Angecourt AMPure XP, как описано выше. Концентрацию ДНК в полученных образцах определяют с использованием флуориметра Qubit 2.0 (Invitrogen, США) с использованием Quant-iT dsDNA BR Assay Kit (Invitrogen, США). Концентрация ДНК в полученных образцах должна находиться в интервале от 1 до 30 нг/мкл.

Далее содержимое всех восьми пробирок смешивают в эквимолярной пропорции. Качество суммарной библиотеки ампликонов 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 библиотеки ампликонов хранят при -20°C.

4.2. Секвенирование библиотеки ампликонов.

Клональную амплификацию библиотеки ампликонов осуществляют с использованием автоматической системы Ion OneTouch 2 System, набора Ion PGM™ Template OT2 400 Kit и магнитных частиц Dynabeads® MyOne C1 согласно инструкциям производителя.

Оценку качества обогащенных бусин производят с использованием набора Ion Sphere Quality Control assay согласно инструкциям производителя.

Секвенирование библиотеки ампликонов осуществляют с использованием генетического анализатора Ion Torrent PGM и наборов Ion PGM™ Sequencing 400 Kit и Ion 314™ Chip Kit v2 согласно инструкциям производителя.

5. Список использованных источников и нормативных документов.

1. Ion PGM Sequencing 400 kit User Guide. Publication Number MAN0007242. Revision 2.0.
2. Ion PGM Template OT2 400 Kit. Publication Number MAN0007218. Revision A.0.
3. High Fidelity PCR Enzyme Mix. User Manual.