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. Нуркалиев
«___» _____ 2015 г.

МЕТОДИКА ПОЛУЧЕНИЯ ГЕНОМА ЕДИНИЧНОЙ ЭУКАРИОТИЧЕСКОЙ КЛЕТКИ

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

Лабораторная методика предназначена для амплификации ДНК из единичных клеток, полученных с помощью лазерной микродиссекции, биопсии, либо из суспензионных клеточных культур. Полученная ДНК может быть использована для полногеномного, экзомного секвенирования.

2. Принцип методики

Настоящая методика основана на методе амплификации с множественным замещением цепи (multiple displacement amplification – MDA). Данный метод основан на использовании ДНК полимеразы phi29, способной удлинять случайные праймеры с замещением цепи, что позволяет амплифицировать ДНК из малых количеств.

3. Оборудование и материалы

3.1 Оборудование

3.1.1 Автоматические пипетки Eppendorf, Германия
3.1.2 Настольная центрифуга MiniSpin plus, Eppendorf, Германия
3.1.3 Амплификатор Veriti 96-Well Thermal Cycler, Thermo Fisher Scientific, США
3.1.4 Стереомикроскоп SZ51, Olympus, Япония
3.1.5 Вортекс V-1, Biosan, Латвия
3.1.6 Спектрофотометр NanoDrop 2000, Thermo Fisher Scientific, США
3.1.7 Флуориметр Qubit 2.0, Invitrogen, США

3.2 Материалы

3.2.1 Наконечники 10, 100, 200, 1000 мкл с фильтром SSI (США)
3.2.2 ПЦР пробирки SSI (США)
3.2.3 Соли и химические реактивы фирмы Sigma (США)
3.2.4 Культуральные чашки Eppendorf (Германия)
3.2.5 Стеклянные капилляры Microcaps Drummond (США)
3.2.6 Набор High Pure PCR Product Purification Kit, Roche Applied Science (Германия)
3.2.7 Набор illustra GenomiPhi V2 DNA Amplification Kit, GE Healthcare Life Sciences (США)
3.2.8 Набор Qubit dsDNA HS Assay Kit, Invitrogen (США)
3.2.9 Пробирки Qubit Assay Tubes, Invitrogen (США)
3.2.10 Пробирки LoBind tubes 1.5 мл, Eppendorf (Германия)

4. Методика амплификации ДНК из единичных клеток

4.1 Подготовка единичных клеток

Для клеток, выращенных в культуральной среде, либо трипсинизированных клеточных культур необходимо провести промывку клеточного материала. Для этого к 100 мкл клеточной суспензии добавляют 500 мкл PBS буфера и центрифугируют в течение 5 минут при 4000g. После этого удаляют супернатант и добавляют 500 мкл свежего PBS буфера и повторяют центрифугирование. Полученный осадок ресуспендируют в 100 мкл PBS буфера. Данная промывка является не обязательной при использовании клеток, полученных с помощью системы лазерной микродиссекции, биопсии.

На следующем этапе для каждой анализируемой клетки готовят ПЦР пробирку, содержащую 1.5 мкл лизирующего буфера (50 мМ DTT, 200 мМ KOH). Далее на культуральную чашку в несколько рядов наносят 3 капли (по 3 мкл) и 1 каплю (20 мкл) буфера W (14мМ NaCl, 0.2 мМ KCl, 0.04 мМ $NaH_2PO_4*2H_2O$, 5.5 мМ глюкозы, 1.2 мМ $NaHCO_3$, 0.02 мМ ЭДТА, 0.01% феноловый красный, 15 мг/мл BSA). В большую каплю при помощи стеклянного капилляра переносят 1-2 мкл клеток. Далее проводят промывку единичных клеток путем поочередного переноса клеток в капли буфера W стеклянным капилляром под стереомикроскопом. Затем отдельные клетки помещают в подготовленные ПЦР пробирки с лизирующим буфером. При проведении амплификации ДНК из единичных клеток необходима постановка отрицательного контроля, для этого в ПЦР пробирку с лизирующим буфером переносят 1 мкл буфера W. Подготовленные клетки замораживаются при -20°C или -80 ^{o}C не менее 30 мин.

Полученные образцы могут храниться не более 1 недели при -20°C или -80°C.

4.2 Амплификация ДНК

Перед реакцией амплификации ДНК проводят лизис отобранных единичных клеток. Для этого полученные образцы инкубируют в амплификаторе при 65°C в течение 10 мин, после чего переносят ПЦР пробирки в лед. Далее к клеткам добавляют 9 мкл буфера (Sample Buffer) из набора illustra GenomiPhi V2 DNA Amplification Kit и помещают пробирки на лед. Для каждой реакции готовят смесь из 9 мкл реакционного буфера (Reaction buffer) и 1 мкл фермента (Enzyme Mix). Добавляют подготовленную смесь в образец, перемешивают на вортексе, инкубируют в амплификаторе при 30°C в течение 2 часов, затем при 65°C 10 мин для инактивации фермента. После завершения амплификации образцы могут храниться при 4°C не более 16 часов.

4.3 Очистка ДНК после реакции амплификации

Очистку ДНК проводят с помощью набора High Pure PCR Product Purification Kit. В образцы добавляют 80 мкл буфера low TE и 500 мкл Binding buffer, тщательно перемешивают. Помещают спин-колонку в собирательную пробирку. Реакционную смесь переносят на колонку, центрифугируют на максимальной скорости в течение 60 секунд в настольной центрифуге. Фильтрат удаляют из собирательной пробирки и добавляют в колонку 500 мкл Wash buffer.

Центрифугируют 1 мин на максимальной скорости. Фильтрат удаляют и добавляют 200 мкл Wash buffer, центрифугируют в течение 1 мин. Для элюции очищенной ДНК спин-колонку переносят в новую 1,5 мл центрифужную пробирку и наносят 100 мкл Elution buffer, центрифугируют в течение 1 минуты на максимальной скорости.

Оценка количества амплифицированной ДНК.

Измерение концентрации полученной ДНК проводят с помощью спектрофотометра NanoDrop, либо флуориметром Qubit 2.0. Количество ДНК после амплификации методом MDA должно составлять около 1 -2 мкг, тогда как в отрицательном контроле – не более 10 нг/мкл (синтезируется путем *de novo* синтеза ДНК с вырожденных праймеров).

5. Список использованных источников

1. illustra GenomiPhi V2 DNA Amplification Kit, Part Number 25-6600-30WP, Rev B, 2006.
2. Spits C., *et al* (2006), Nature Protocols, V.1, No.4, 1965-1970.
3. High Pure PCR Product Purification Kit, Part Number 11 732 668 001, Rev. 16, 2010.