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

Проректор по научной деятельности

ФГАОУ ВПО КФУ

_____ Д.К. Нургалиев

«____» _____ 2015 г.

МЕТОДИКА ШОТГАН-СЕКВЕНИРОВАНИЯ МАЛЫХ ГЕНОМОВ

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 подготовки фрагментных библиотек для последующего секвенирования с использованием секвенаторов второго поколения GS Junior.

2. Принцип методики

Методика основана на подготовке фрагментных библиотек из высокомолекулярной недеградированной геномной ДНК прокариотических организмов и вирусов. Фрагментация геномной ДНК в диапазоне 700-1800 пар нуклеотидов и направленный отбор фрагментов в более узком диапазоне длин согласно рекомендациям производителя позволяет эффективно использовать результаты секвенирования библиотек в процедуре сборки.

3. Оборудование и материалы.

3.1. Оборудование

3.1.1. Автоматические пипетки Eppendorf (США)

3.1.2 Автоматические пипетки Ленпипет (Thermo Fisher Scientific, США)

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

3.1.4. Настольная центрифуга MiniSpin Plus (Eppendorf, США)

3.1.5. Флуориметр Qubit 2.0 (Invitrogen, США)

3.1.6. Микрофлюидная система BioAnalyzer 2100 (Agilent, США

3.1.7. Штатив для магнитной сепарации DynaMag-2 (Invitrogen, США)

3.1.8. Устройство для фрагментации Nebulizer (Roche, Швейцария)

3.2. Материалы.

3.2.1. Набор Rapid Library Preparation Kit (Roche, Швейцария)

3.2.2. Набор Rapid Library MID Adaptors Kit (Roche, Швейцария)

3.2.3. Набор Qubit dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen, США)

3.2.4. Набор Qubit dsDNA BR Assay Kit (Invitrogen, США)

3.2.5. Магнитные частицы Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, США)

3.2.6. Пробирки Qubit Assay Tubes (Invitrogen, США)

3.2.7. Пробирки LoBind tubes 1,5 мл (Eppendorf, США)

3.2.8. Набор Agilent High Sensitivity DNA kit (Agilent Technologies, США)

3.2.9. Химические реактивы Sigma (США)

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

3.2.11. Маркер молекулярного веса AmpliSize Molecular Ruler (Bio-Rad, США)

4. Методика приготовления фрагментных библиотек

4.1. Фрагментация геномной ДНК

Для получения фрагментов длиной 700-1800 пар нуклеотидов 1 мкг геномной ДНК, растворенной в 100 мкл ТЕ-буфере, помещают в устройство для фрагментации Nebulizer Condensor, добавляют 500 мкл буфера для небулизации (Roche, Швейцария) и пропускают азот под давлением 15 psi (1 бар) в течение 1 минуты. После фрагментации проводят очистку образца. Для этого добавляют 1,8 объема магнитных частиц Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, США) к образцу, затем инкубируют при комнатной температуре в течение 5 минут, после чего осаждают магнитные частицы со связанными фрагментами ДНК на магнитном штативе DynaMag-2 (Invitrogen, США). Отбирают супернатант и проводят трехкратную промывку осажденных на магните частиц 200 мкл 70% этанола. Промытые частицы высушивают на воздухе при комнатной температуре в течение 5 минут. Элюцию проводят 16 мкл ТЕ-буфера.

4.2. Конструирование фрагменнтной библиотеки

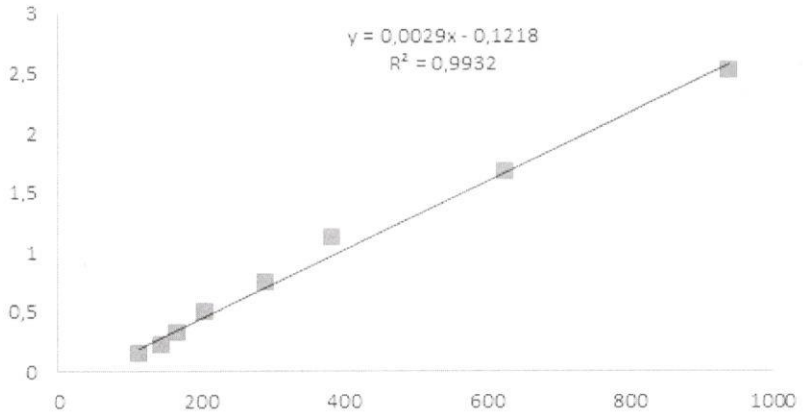
Конструирование библиотеки осуществляют согласно рекомендациям производителя. К полученным фрагментам "пришивают" адапторы Rapid Library MID Adaptors Kit (Roche, Швейцария), содержащие уникальные шестибуквенные последовательности - баркоды.

Отбор фрагментов ДНК по размеру (size selection) осуществляют с помощью магнитных частиц Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, США) согласно протоколу подготовки библиотек для секвенирования с целью получения фрагментов, размер которых укладывается в требуемый диапазон длин 700-1800 пар нуклеотидов.

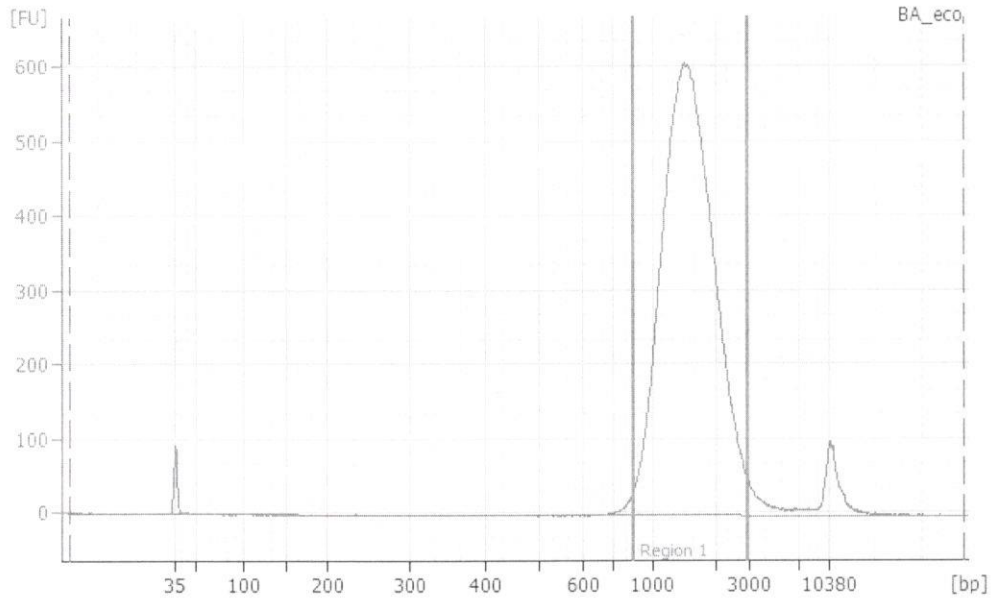
Концентрацию ДНК фрагментной готовой библиотеки определяют с использованием флуориметра Qubit 2.0 (Invitrogen, США) с использованием dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen, США). Для расчета количества молекул ДНК в 1 мкл образца осуществляют построение стандартной кривой с помощью RL Standard.

Таблица разведений стандарта и пример стандартной кривой:

Номер разведения	RL Standard (мол/мкл)
1	$2,5*10^9$
2	$1,67*10^9$
3	$1,11*10^9$
4	$7,41*10^8$
5	$4,94*10^8$
6	$3,29*10^8$
7	$2,19*10^8$
8	$1,46*10^8$



Качество фрагментной библиотеки оценивают с использованием микрофлюидного анализатора BioAnalyzer 2100 (Agilent, США). Основными параметрами для оценки являются размер и форма пика, а также отсутствие сигнала в области 50-100 пар нуклеотидов:



Готовый образец фрагментной библиотеки хранят при -20°C.

5. Секвенирование фрагментных библиотек

Клональную амплификацию библиотеки осуществляют с помощью набора GS Junior Titanium emPCR kit (Lib-L) согласно инструкциям производителя.

Оценку качества обогащения бусин производят с помощью прибора GS Junior Bead Counter v2.

Секвенирование библиотеки осуществляют с использованием пиросеквенатора GS Junior и наборов GS Junior Titanium PicoTiterPlate kit и GS Junior Titanium Sequencing Kit согласно инструкциям производителя.

6. Список использованных источников и нормативных документов.

1. Rapid Library Preparation Method Manual, March 2012. User Manual.

2. emPCR Amplification Method Manual - Lib-L, March 2012. User Manual.

3. Sequencing Method Manual, January 2013. User Manual