Н.Е. Гоголева, Е.И. Шагимарданова

ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ И НАНОПОРОВОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ

Учебно-методическое пособие

Н.Е. Гоголева, Е.И. Шагимарданова

ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ И НАНОПОРОВОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ

Учебно-методическое пособие

КАЗАНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
2022

УДК 575.113.2: 577.212.3
ББК 28.04
С 59

Печатается по рекомендации Учебно-методической комиссии Института фундаментальной медицины и биологии КФУ

Рецензент –
ведущий научный сотрудник НЦ «Регуляторная геномика»,
к.б.н. О. А. Гусев

Гоголева Н. Е.
С 59 Подготовка образцов и нанопоровое секвенирование. Учебно-методическое пособие / Н.Е. Гоголева, Е.И Шагимарданова / - Казань: Казан. ун-т, 2022. – 28 с.

В учебно-методическом пособии рассмотрены поэтапные действия при подготовке образцов для последующего секвенирования, включая выделение ДНК, подготовку библиотек, проведение секвенирования и первичный анализ данных. Предназначено для студентов биологического направления подготовки, изучающих курсы «Современные методы в биологии» (по направлениям), «Большой практикум» (по направлениям), «Физико-химические методы биологических исследований», «Молекулярная систематика и филогенетика» и др., а также для студентов медицинских направлений подготовки.

УДК 575.113.2: 577.212.3
ББК 28.04

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ

Нанопоровое секвенирование — это уникальная технология, позволяющая проводить прямой анализ длинных фрагментов ДНК или РНК в режиме реального времени, основанная на изменении электрического тока в момент прохождения нуклеиновых кислот через белковые нанопоры. Быстрый прогресс в технологиях нанопор для секвенирования отдельных длинных молекул ДНК и РНК привел к существенному повышению точности, длины считывания и пропускной способности пор. Технология нанопорового секвенирования была коммерциализована компанией *Oxford Nanopore Technologies*, которая на сегодняшний день производит целый ряд геномных секвенаторов и необходимых расходных материалов. Секвенирование с помощью нанопор применяется для сборки геномов, обнаружения полноразмерных транскриптов, поиска модификаций нуклеотидов. Применение набирает обороты в более специализированных прикладных областях, таких как быстрая клиническая диагностика и эпидемиологический надзор.

Технология основана на использовании нанопор белка, которые служат биосенсором и встроены в электрически устойчивую полимерную мембрану (рис. 1). В растворе электролита прикладывается постоянное напряжение для создания ионного тока через нанопору, так что отрицательно заряженные одноцепочечные молекулы ДНК или РНК проходят через нанопору с отрицательно заряженной *цис*-стороны на положительно заряженную *транс*сторону. Скорость транслокации контролируется моторным белком, который продвигает молекулу нуклеиновой кислоты через нанопору. Изменения ионного тока во время транслокации соответствуют нуклеотидной последовательности, присутствующей в сенсорной области, и расшифровываются с использованием вычислительных алгоритмов, позволяющих секвенировать отдельные молекулы в реальном времени. В дополнение к контролю скорости транслокации моторный белок обладает хеликазной активностью, позволяя раскручивать двухцепочечную ДНК или дуплексы РНК-ДНК в одноцепочечные молекулы, которые проходят через нанопоры (https://nanoporetech.com/applications/dna-nanopore-sequencing).

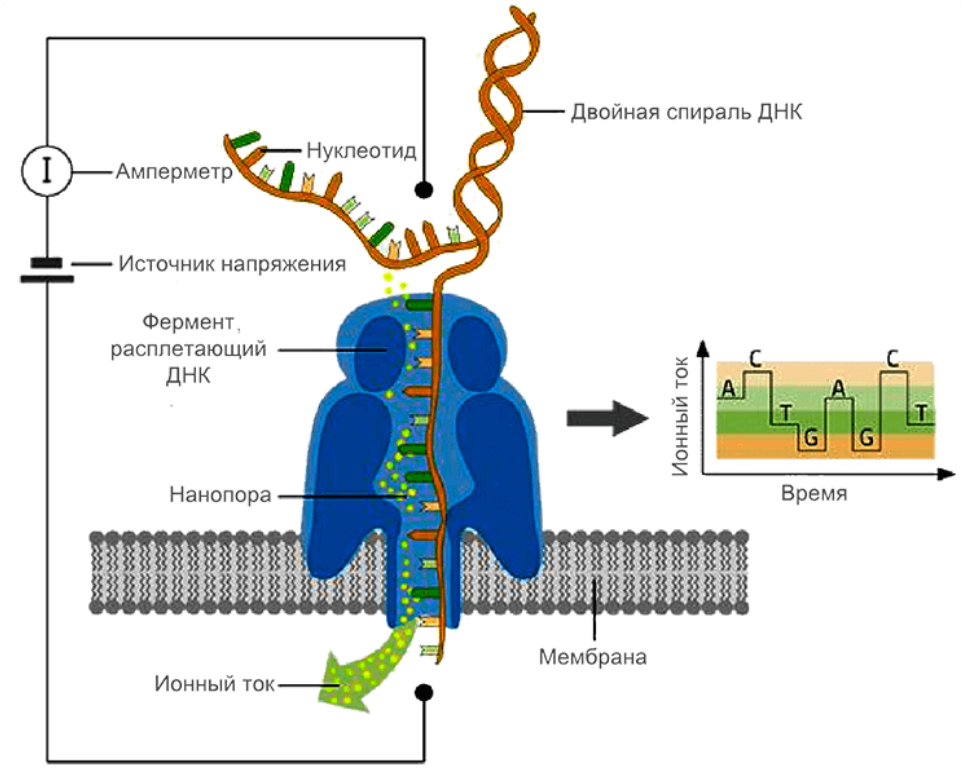

Рис. 1. Схематическое изображение принципа технологии нанопорового секвенирования (https://biomolecula.ru/articles/nanoporovoe-sekvenirovanie-na-poroge-tretei-genomnoi-revoliutsii)

Считается, что точность секвенирования с помощью нанопор значительно ниже, чем при использовании других подходов, в частности при сравнении с секвенированием путем синтеза (Illumina). Однако большим преимуществом нанопорового секвенирования является длина получаемого фрагмента. При секвенировании с помощью Illumina максимальная длина чтения составляет 300 п.н. Метод нанопорового секвенирования основан на физическом процессе транслокации нуклеиновых кислот, что обеспечивает возможность длинных прочтений до десятков тысяч нуклеотидов.

Дополнительным преимуществом нанопорового секвенирования является небольшой размер приборов, что обеспечивает относительную мобильность и возможность секвенирования вне стен лаборатории.

Однако для получения прочтений значительной длины необходимо оптимально проводить пробоподготовку. Условием получения длинных прочтений является наличие качественной высокомолекулярной ДНК. Если стартовый материал является сильно фрагментированным и деградированным, получить длинные риды не представляется возможным. Методику выделения

ДНК необходимо тщательно подбирать для каждого типа образца. В настоящих методических рекомендациях представлены базовые протоколы выделения и очистки ДНК, подготовки библиотеки для секвенирования, описание загрузки образца и собственно процесса секвенирования.

1. ВЫБОР ПРИБОРА ДЛЯ НАНОПОРОВОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

Важным фактором нанопорового секвенирования является пропускная способность ячейки. Для решения задач разного масштаба *Oxford Nanopore Technologies* выпустила несколько платформ (секвенаторов) (рис.2).

Рис. 2. Линейка приборов *Oxford Nanopore Technologies* для нанопорового секвенирования

MinION является самым популярным и самым компактным секвенатором. Выпускается в двух модификациях: **MinION**, требующий подключения к компьютеру, но настолько маленький и легкий, что умещается на ладони, и **MinION Mk1C**, который может работать независимо и при этом остается компактным.

GridION позволяет одновременно запускать до пяти ячеек, увеличивая таким образом производительность. Для секвенаторов MinION и GridION доступен специальный адаптор **Flonge.**

PromethION является самой высокопроизводительной платформой. Выпускается в нескольких модификациях: PromethION**2 Solo** (требует подключения к компьютеру или к секвенатору GridION) и **PromethION2** (имеет управляющий модуль и процессор для обработки данных) обеспечивают считывание двух высокопроизводительных ячеек за один запуск, **PromethION24** и **PromethION48** позволяют запускать одновременно и при этом независимо контролировать 24 и 48 ячеек соответственно.

Сравнительная характеристика различных моделей представлена в таб. 1.

Таблица 1.

Характеристики моделей секвенаторов *Oxford Nanopore Technologies*

Модель секвенатора	**Flonge**	**MinION**	**GridION**	**PromethION2 (Solo)**	**PromethION24**	**PromethION48**
Количество проточных ячеек	2	1	5	2	24	48
Теоретический выход данных при использовании набора версии 10/11*	2,8Гб	50Гб	250Гб (50 Гб на ячейку)	До 580Гб (290 Гб на ячейку)	До 7 Тб (290Гб на ячейку)	До 14 Тб (290Гб на ячейку)
Теоретический выход данных при использовании набора версии 12*	1,6Гб	30Гб	150Гб (30 Гб на ячейку)	До 340Гб (170 Гб на ячейку)	До 4 Тб (170Гб на ячейку)	До 8 Тб (170Гб на ячейку)

*Теоретический выход данных – теоретическая максимальная производительность при работе прибора в течение 72 часов со скоростью 420 нуклеотидов/сек (при использовании набора версии 10/11) или 250 нуклеотидов/сек (при использовании набора версии 12). При использовании адаптера Flonge расчетные данные при работе прибора в течение 16 часов.

Ожидаемый объем данных, полученных с проточной ячейки, зависит преимущественно от нескольких факторов:

(1) количества активных нанопор в ячейке. Количество нанопор может варьировать в разных партиях товара. Поэтому необходимо проводить оценку жизнеспособности ячейки в течение 2 месяцев после получения. При количестве активных пор ниже заявленного производитель заменяет товар;

(2) скорости транслокации ДНК/РНК через нанопоры;

(3) времени работы. Время работы может варьировать в зависимости от возможностей исследователя, особенностей библиотеки, наличия загрязняющих примесей в образце.

2. ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК

Выделение ДНК – стандартная процедура в самых разных молекулярно-биологических исследованиях. Однако если стоит задача получения длинных чтений при помощи нанопорового секвенирования, методу выделения ДНК следует уделить пристальное внимание. При использовании стандартных наборов ДНК зачастую фрагментируется, что не позволит использовать все преимущества нанопор. Для выделения и очистки ДНК с высокой молекулярной массой на рынке представлен ряд специализированных наборов (Рис. 3).

Рис. 3. Внешний вид наборов, предназначенных для выделения высокомолекулярной ДНК

Monarch® HMW DNA Extraction Kit (New England Biolabs). Решение основано на использовании крупных, гладких стеклянных шариков для преципитации высокомолекулярной ДНК.

NucleoBond® HMW DNA (Takara Bio). Подход основан на использовании анион-обменной технологии.

MagAttract® HMW DNA Kit (Qiagen). В основе данного набора лежит протокол с использованием магнитных частичек.

Классическим методом для получения длинных фрагментов ДНК считается выделение с помощью фенол-хлороформа. Этот метод является наиболее универсальным и может быть использован для самых разных образцов.

2.1. Выделение ДНК с помощью фенол-хлороформной экстракции

Принцип метода заключается в разделении фаз водного раствора с ДНК и фенол-хлороформной смеси и удалении вместе с органической фазой белков и липидов (Sambrook and Russel, 2001). Из плюсов метода можно отметить большой выход ДНК высокой молекулярной массы, универсальность для разных

типов образцов, невысокую себестоимость. Из недостатков - требует дополнительных мер предосторожности и наличия вытяжного шкафа в связи с токсичностью паров фенола: по степени тяжести воздействия на человеческий организм фенол относится к высокоопасным веществам. Кроме того, работа с фазами требует определенных навыков и мастерства исследователя.

Необходимые реагенты:

- буфер для лизиса (100 мМ Трис, pH 8.0 : 50 мМ ЭДТА);
- 1% додецилсульфат натрия (SDS);
- 0.75 мг/мл протеиназы К;
- 0.05 мг/мл РНКазы А;
- раствор фенол/хлороформ/изоамиловый спирт (25:24:1), pH 7,8-8,2
  Важно! кислый pH заставляет ДНК переходить в фенольный слой, в то время как РНК при высокой кислотности переходит в водный слой
- хлороформ/изоамиловый спирт (24:1);
- буфер для элюирования ТЕ (10 мМ трис-HCl, pH 8,5; ЭДТА 1 мМ);
- ацетат натрия, 3М;
- 100% охлажденный этанол;
- 70% этанол.

Необходимо помнить, что для получения высокомолекулярной ДНК, пригодной для нанопорового секвенирования, крайне важно качество исходного образца. Лучше всего использовать живые ткани или клетки, при этом быстро лизировать их в контролируемых условиях. Свежеотобранный образец тканей необходимо немедленно заморозить в жидком азоте. Перед лизисом ткани образца растереть пестиком в ступке с использованием жидкого азота. Культуры клеток необходимо лизировать сразу без предварительной заморозки.

Процедура выделения

1. В зависимости от исходного образца:
   а) к 0,2 мг ткани, предварительно растертой в жидком азоте, добавьте 1 мл лизирующего буфера, быстро и тщательно перемешайте;
   б) к клеточной культуре (~ $1x10^6$ клеток) добавьте 1 мл лизирующего буфера, перемешайте, аккуратно перенесите лизат в пробирку.
2. Инкубируйте лизат в термостате при 56˚С минимум 3 часа. Предпочтительно оставить инкубацию на ночь.

<u>Далее все манипуляции проводить строго в перчатках в вытяжном шкафу!</u>

3. Добавьте равный объем смеси фенол-хлороформ-изоамиловый спирт (примерно 1 мл), тщательно бережно (на качалке) перемешайте до получения однородной суспензии.
4. Центрифугируйте 10 минут при 10 000g при комнатной температуре.
5. Аккуратно отберите водную верхнюю фазу в чистую пробирку, стараясь не задевать интерфазу и нижнюю фенольную фазу (примерно 800-900 мкл).
6. Измерьте получившийся объем водной фазы и добавьте равный объем хлороформ/изоамиловый спирта, тщательно перемешайте.
7. Повторите этапы 4 и 5 еще раз.
8. Измерьте получившийся объем. К супернатанту добавьте 1/10 объема 3М ацетата натрия и 0,8 объема изопропанола от объема образца. Аккуратно перемешайте, плавно переворачивая пробирку. При этом начнет формироваться сгусток ДНК.
9. Инкубируйте в течение 20 минут при комнатной температуре.
10. Центрифугируйте при 13 000g 10 минут при комнатной температуре.
11. Осадок ДНК дважды промойте 70% спиртом. Добавьте к осадку 300-400 мкл 70% этилового спирта, отделите постукиванием осадок от стенки пробирки и центрифугируйте при 13 000 g 5 минут.
12. Аккуратно уберите этанол. Осадок держится на стенке пробирки неплотно, будьте внимательны. Капли этанола необходимо высушить на воздухе, при этом стараясь не пересушивать осадок.
13. Растворите осадок в буфере ТЕ (10:1) в течение 20 минут или больше. Можно оставить ДНК растворяться в течение ночи в холодильнике.

2.2. Проведение дополнительной очистки ДНК от полисахаридов

Возможность генерировать длинные чтения на платформе секвенирования Oxford Nanopore Technologies зависит от длины выделенной ДНК и наличия/отсутствия примесей в препарате ДНК. При работе с нестандартными образцами (например, с насекомыми) выделенная высокомолекулярная ДНК может быть загрязнена полисахаридами. Полисахариды сложно отделить от ДНК, поскольку они схожи по своим свойствам. Для проведения дополнительного этапа очистки от полисахаридов можно использовать метод осаждения ДНК с использованием CTAB (*cetriltrimethylammonium bromide*). CTAB — сильный детергент и при низкой ионной силе (до 0,4M NaCl) ДНК и

CTAB образуют нерастворимый комплекс. Полисахариды при этом остаются в растворе. Комплекс нуклеиновых кислот с CTAB можно растворить только при высокой ионной силе (1M NaCl).

Протокол осаждения

1. К раствору ДНК добавьте равный объем 3 % CTAB
2. Перемешайте и прогрейте до 65°C.
3. Центрифугируйте при 12 000 g, 10-15 минут при комнатной температуре. Удалите супернатант.
4. Растворите осадок в 50-100 мкл 1M NaCl. При необходимости прогрейте до 65°C.
5. Добавьте 2,5 объема 96% этанола. Дождитесь формирования осадка ДНК.
6. Центрифугируйте при 12 000 g, 15 минут при комнатной температуре. Удалите супернатант.
7. Осадок дважды промойте 70% этанолом.
8. Растворите в ТЕ буфере.

2.3. Селективное осаждение ДНК

Несмотря на то, что и фенол-хлороформная экстракция и специальные наборы позволяют выделять высокомолекулярную ДНК, в препарате могут оставаться и достаточно короткие фрагменты ДНК. Чрезмерно представленные небольшие фрагменты могут снизить желаемый выход данных секвенирования из-за более высокой эффективности как лигирования адаптера, так и транслокации через нанопоры коротких фрагментов. Поэтому целесообразно удалять нежелательные короткие фрагменты из препарата ДНК. Для удаления таких фрагментов ДНК и для получения желаемого распределения по длинам можно применить специальные наборы Short Read Eliminator kit (Circulomics). Такие наборы можно использовать для быстрой селекции ДНК с высокой молекулярной массой. Селекция с помощью различных вариаций наборов Short Read Eliminator kit (SRE) может значительно улучшить среднее значение длины чтения за счет постепенного истощения короткой ДНК до 10 т.п.н. (SRE XS), 25 т.п.н. (SRE) или 40 т.п.н. (SRE XL) (Рис. 4).

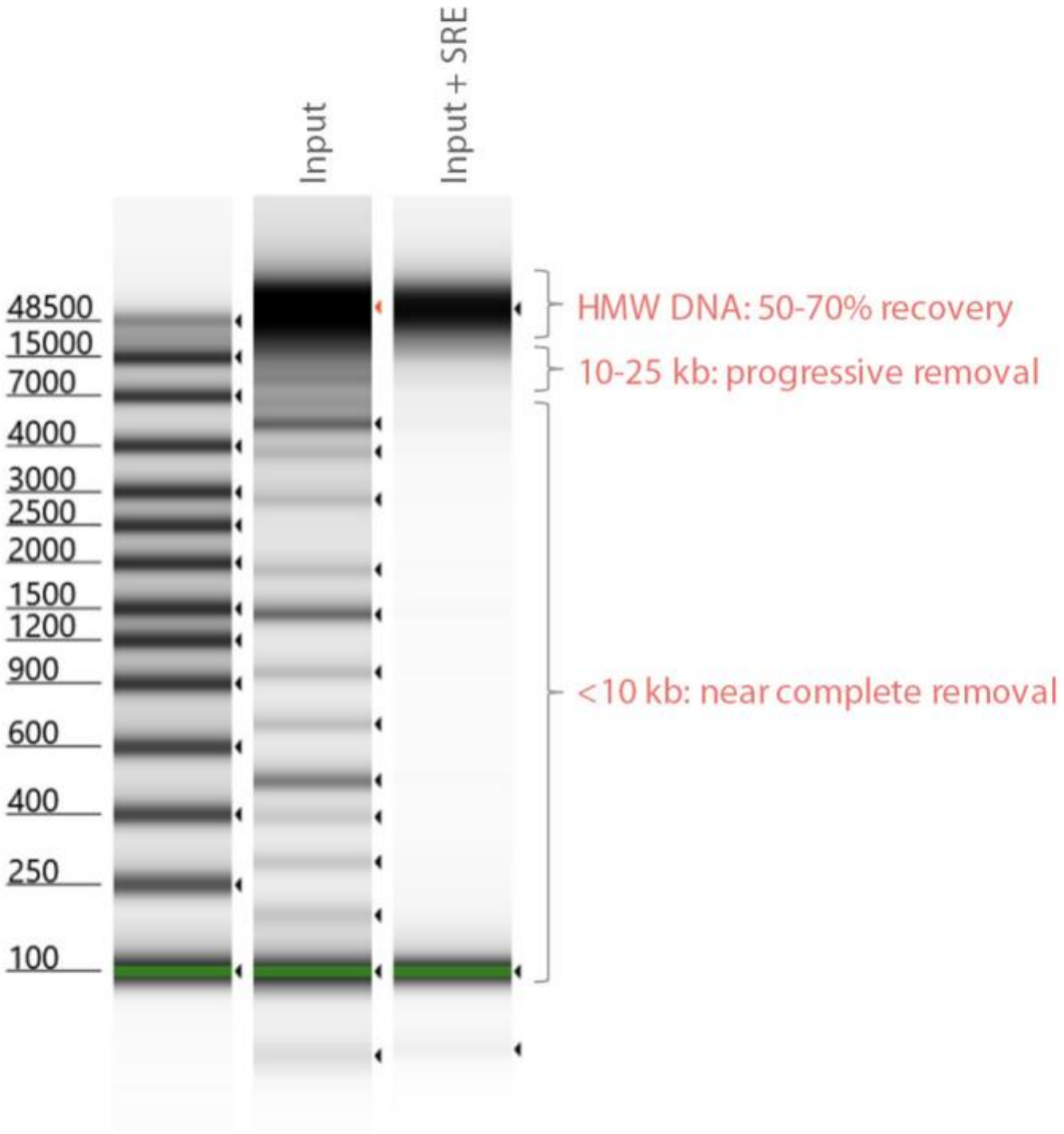

Рис. 4. Электрофореграмма селективного осаждения высокомолекулярной ДНК с использованием набора Short Read Eliminator Kit
(Источник: Short Read Eliminator Kit Handbook v 2.0)

Высокомолекулярная ДНК должна иметь длину более 48 т.п.н. Концентрация ДНК должна быть не менее 50 нг/мкл для наборов SRE и SRE XL, и не менее 25нг/мкл для набора SRE XS. Концентрацию нужно подтвердить с использованием набора Qubit™ dsDNA Broad Range Assay kit (Thermo Fisher).

Протокол осаждения

1. Доведите очищенный образец высокомолекулярной ДНК до общего объема 60 мкл и концентрации от 50 до 150 нг/мкл. Внесите образец в 1,5 мл пробирку Eppendorf DNA LoBind™. Разбавлять образец до необходимой

концентрации следует буфером TE (pH 8.0), буфером EB или водой, свободной от нуклеаз.

2. Добавьте к образцу 60 мкл буфера SRE, SRE XL или SRE XS. Тщательно перемешайте, осторожно постукивая по пробирке или осторожно пипетируя.
3. Центрифугируйте при 10 000 g в течение 30 минут при комнатной температуре.
4. Осторожно удалите супернатант из пробирки, не нарушая осадок ДНК.
5. Добавьте 200 мкл 70% этанола в пробирку и центрифугируйте при 10 000 g в течение 2 мин при комнатной температуре. После добавления 70% спирта не встряхивайте и не перемешивайте содержимое пробирки. Поместите пробирку прямо в центрифугу.
6. Осторожно удалите промывочный раствор из пробирки, не нарушая осадок ДНК.
7. Повторите этапы 5 и 6 еще раз.
8. Добавьте 50–100 мкл буфера EB в пробирку и инкубируйте при комнатной температуре в течение 20 минут. Объем буфера можно менять в зависимости от количества ДНК в образце.
9. После инкубации аккуратно постучите по пробирке, чтобы убедиться, что ДНК полностью ресуспендирована.
10. Анализ чистоты препарата ДНК проводите с помощью спектрофотометра NanoDrop и флуориметра Qubit™, а также с помощью электрофоретического разделения ДНК.

2.4. Требования, предъявляемые к препарату ДНК для секвенирования на платформе Oxford Nanopore

Перед тем как приступать к приготовлению библиотеки для секвенирования, необходимо убедиться, что ДНК отвечает следующим параметрам:

- Спектрофотометрические показатели, указывающие на степень чистоты препарата, должны соответствовать OD260/280 =1,8 и OD 260/230=2,0–2,2. Измерение рекомендуется проводить с использованием спектрофотометра для микрообъемов NanoDrop™ (Thermo Fisher Scientific) или Implen NanoPhotometer® (Implen).
- Средний размер фрагмента ДНК, измеренный с помощью гель-электрофореза или пульс-электрофореза должен быть более 30 т.п.н.

- Общая концентрация ДНК, измеренная с помощью флуориметра, например Qubit™, должна составлять около 1 мкг.

Для длительного хранения ДНК с высокой молекулярной массой рекомендуется использовать буфер ТЕ.

3. ПОДГОТОВКА БИБЛИОТЕКИ ДЛЯ СЕКВЕНИРОВАНИЯ НА ПЛАТФОРМЕ OXFORD NANOPORE

Доступен широкий спектр наборов и протоколов для подготовки библиотек для секвенирования на платформе Oxford Nanopore. Одним из самых популярных протоколов, который используется для различных задач, является набор SQK-LSK109. Обзор протокола представлен на рис. 5. Данный протокол не содержит этапа фрагментации ДНК, однако в некоторых случаях фрагментация образца может оказаться выгодной. Например, при работе с меньшим количеством геномной ДНК (100–500 нг) фрагментация увеличит количество молекул ДНК и, следовательно, повысит пропускную способность пор.

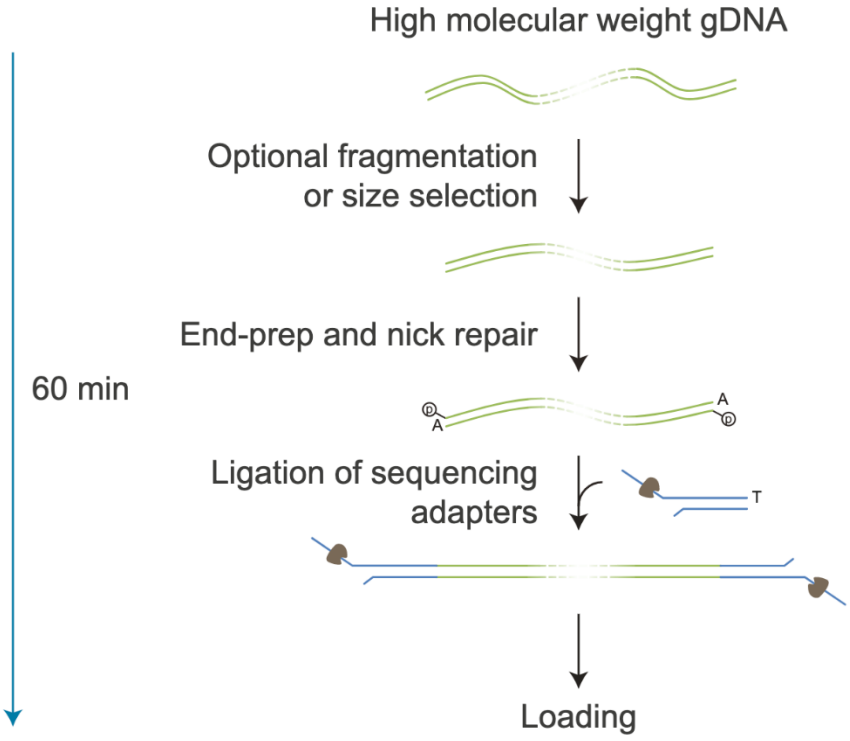

Рис. 5. Схема протокола подготовки образца ДНК с помощью набора для секвенирования (SQK-LSK109).

Реагенты и расходные материалы

- 0,2 мл тонкостенные пробирки для ПЦР;
- пробирки Eppendorf DNA LoBind объемом 1,5 мл;
- вода без нуклеаз (например, ThermoFisher, каталожный № AM9937);
- NEBNext FFPE DNA Repair Mix (M6630);
- модуль NEBNext Ultra II End Repair / dA-tailing Module (E7546);
- магнитные частицы Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter Inc);
- Свежеприготовленный 70% этанол в воде без нуклеаз;
- Набор для секвенирования (SQK-LSK109). Схематическое расположение реактивов в наборе представлено на рис. 6;
- проточная ячейка R9.4.1.

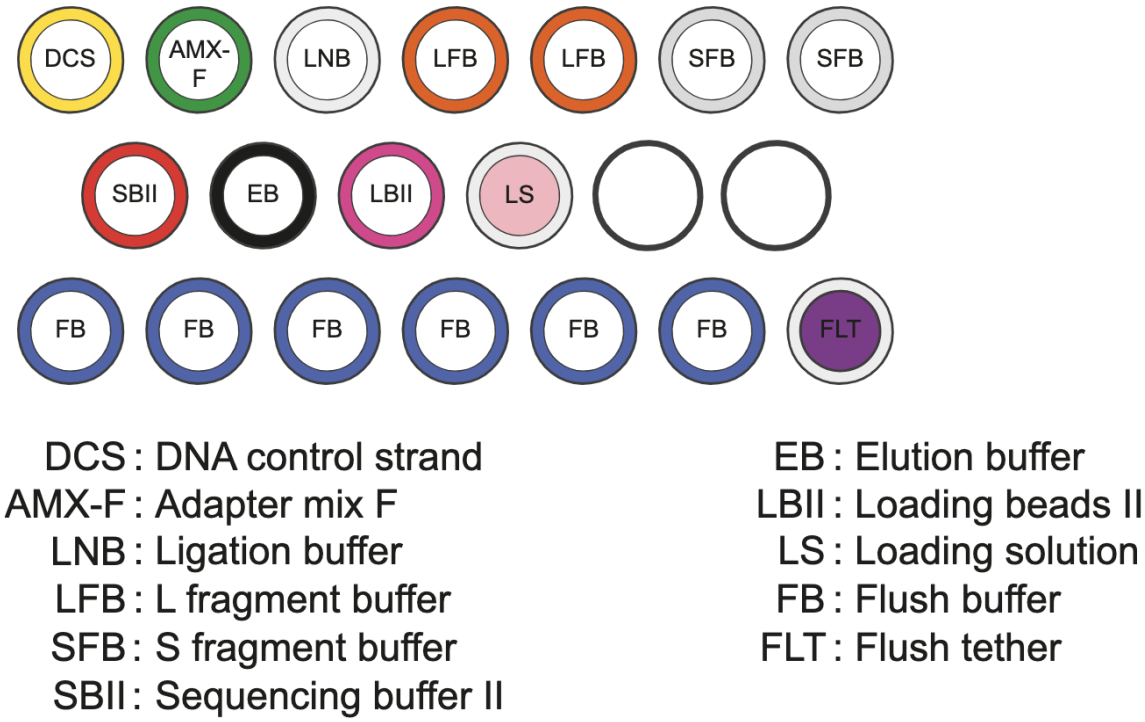

Рис. 6. Схема протокола подготовки образца ДНК с помощью набора для секвенирования (SQK-LSK109)

Процесс подготовки библиотеки для нанопорового секвенирования при помощи набора SQK-LSK109 является достаточно быстрым. Его условно можно разделить на несколько этапов.

1. Восстановление концов ДНК
2. Очистка ДНК с помощью магнитных частиц

3. Лигирование сиквенсового адаптера
4. Очистка ДНК-библиотеки с помощью магнитных частиц

3.1. Восстановление концов ДНК

1. Перенесите 1 мкг геномной ДНК в 1,5 мл пробирку Eppendorf DNA LoBind и доведите объем до 49 мкл водой без нуклеаз. Тщательно перемешайте, постукивая по пробирке, сбросьте капли коротким центрифугированием.
2. Подготовьте реакционную смесь в тонкостенной пробирке для ПЦР объемом 0,2 мл:

Реагент	**Объем**
ДНК	48 мкл
Буфер для восстановления ДНК NEBNext FFPE	3,5 мкл
NEBNext FFPE DNA Repair Mix	2 мкл
Ultra II End-prep реакционный буфер	3,5 мкл
Смесь ферментов Ultra II End-prep	3 мкл
Общий объем	**60 мкл**

3. Все тщательно перемешайте с помощью пипетки с широким диаметром наконечника. На этом этапе происходит восстановление ДНК и подготовка концов ДНК для прикрепления адаптера.
4. Инкубируйте при 20°C в течение 15 минут и при 65°C в течение 15 минут. Приступите к этапу очистки.

3.2. Очистка ДНК

Магнитные частицы AMPure XP (Beckman Coulter Inc) хранятся при +4°C. Перед работой заранее достаньте их из холодильника (примерно за 20 мин).

1. Ресуспендируйте магнитные частицы AMPure XP путем встряхивания.
2. Перенесите образец ДНК в чистую пробирку Eppendorf DNA LoBind™ объемом 1,5 мл.
3. Добавьте 60 мкл ресуспендированных магнитных частиц AMPure XP и перемешайте, встряхнув пробирку.

4. Инкубируйте в течение 5 минут при комнатной температуре на орбитальном шейкере или периодически переворачивая пробирку.
5. Подготовьте 500 мкл свежего 70% этанола в воде без нуклеаз.
6. Поместите образец на магнит, дождитесь, пока элюат не станет прозрачным и бесцветным. Удалите супернатант.
7. Не убирая пробирку с магнита, добавьте 200 мкл свежеприготовленного 70% этанола, не нарушая осадок. Удалите этанол с помощью пипетки.
8. Повторно добавьте 200 мкл свежеприготовленного 70% этанола, не нарушая осадок. Удалите этанол с помощью пипетки.
9. Сбросьте капли со стенок пробирки коротким центрифугированием и поместите образец обратно на магнит. С помощью пипетки отберите остаточный этанол. Дайте высохнуть в течение ~ 30 секунд, но не сушите осадок до растрескивания.
10. Снимите пробирку с магнитного штатива и ресуспендируйте осадок в 61 мкл воды, свободной от нуклеаз. Инкубируйте в течение 2 минут при комнатной температуре.
11. Поместите пробирку на магнитный штатив и дождитесь, пока элюат не станет прозрачным и бесцветным, в течение не менее 1 минуты.
12. Переместите 61 мкл элюата в чистую пробирку Eppendorf DNA LoBind объемом 1,5 мл.
13. Измерьте концентрацию ДНК в 1 мкл образца с помощью флуориметра Qubit™.

3.3. Лигирование адаптеров

1. Подготовьте все необходимые реактивы. Перемешайте адаптер (AMX) и лигазу Quick T4. Разморозьте буфер для лигирования (LNB) при комнатной температуре и перемешайте пипетированием. Из-за высокой вязкости встряхивание этого буфера будет неэффективным. Разморозите буфер для элюирования (EB) при комнатной температуре, перемешайте встряхиванием, осадите капли коротким центрифугированием. Реагенты поместите на лед сразу после оттаивания и перемешивания.
2. Подготовьте реакционную смесь. В пробирке Eppendorf DNA LoBind™ объемом 1,5 мл смешайте реактивы в следующем порядке:

Реагент	**Объем**
Образец ДНК	60 мкл
Буфер для лигирования (LNB)	25 мкл

ДНК-лигаза NEBNext Quick T4	10 мкл
Адаптер (AMX)	5 мкл
Общий объем	**100 мкл**

3. Тщательно перемешайте смесь и инкубируйте в течение 10-20 минут при комнатной температуре.

3.4. Очистка библиотеки

1. Ресуспендируйте магнитные частицы AMPure XP путем встряхивания.
2. Перенесите образец ДНК в чистую пробирку Eppendorf DNA LoBind объемом 1,5 мл.
3. Добавьте 40 мкл ресуспендированных магнитных частиц AMPure XP и перемешайте, встряхнув пробирку.
4. Инкубируйте в течение 5 минут при комнатной температуре на вращающемся миксере или периодически переворачивая пробирку.
5. Поместите образец на магнит, дождитесь, пока элюат не станет прозрачным и бесцветным. Удалите супернатант.
6. Добавьте 250 мкл буфера LFB, ресуспендируйте магнитные частицы, сбросьте капли со стенок пробирки и поместите образец обратно на магнитный штатив. После того как раствор просветлеет, удалите супернатант с помощью пипетки.
7. Повторно добавьте 250 мкл буфера LFB, ресуспендируйте магнитные частицы, сбросьте капли со стенок пробирки и поместите образец обратно на магнитный штатив. После того как раствор просветлеет, удалите супернатант с помощью пипетки.
8. Сбросьте капли со стенок пробирки в вортекс-центрифуге и поместите образец обратно на магнит. С помощью пипетки отберите остаточную жидкость. Дайте высохнуть в течение ~ 30 секунд, но не сушите осадок до растрескивания.
9. Снимите пробирку с магнитного штатива и ресуспендируйте осадок в 15 мкл буфера для элюирования (EB). Инкубируйте в течение 10 минут при комнатной температуре.

   Для ДНК с высокой молекулярной массой инкубация при 37°C может улучшить выделение длинных фрагментов.

10. Поместите пробирку на магнит и дождитесь, пока элюат не станет прозрачным и бесцветным, в течение не менее 1 минуты.

11. Переместите 15 мкл элюата в чистую пробирку Eppendorf DNA LoBind™ объемом 1,5 мл.
12. Измерьте концентрацию образца в 1 мкл с помощью флуориметра Qubit™. Храните библиотеку на льду до момента загрузки.

4. ЗАГРУЗКА ЯЧЕЙКИ И СЕКВЕНИРОВАНИЕ

1. Ячейку для секвенирования предварительно достаньте из холодильника и оставьте на столе при комнатной температуре на 30 минут. Разморозьте буфер для секвенирования (SQB), загрузочные шарики (LB), промывочные буферы FLT и FB. Перемешайте реагенты и сбросьте капли со стенок пробирки коротким центрифугированием.

2. Откройте крышку MinION Mk1B и вставьте проточную ячейку под зажим. Сильно нажмите на проточную ячейку, чтобы обеспечить правильное ее положение в секвенаторе (рис. 7).

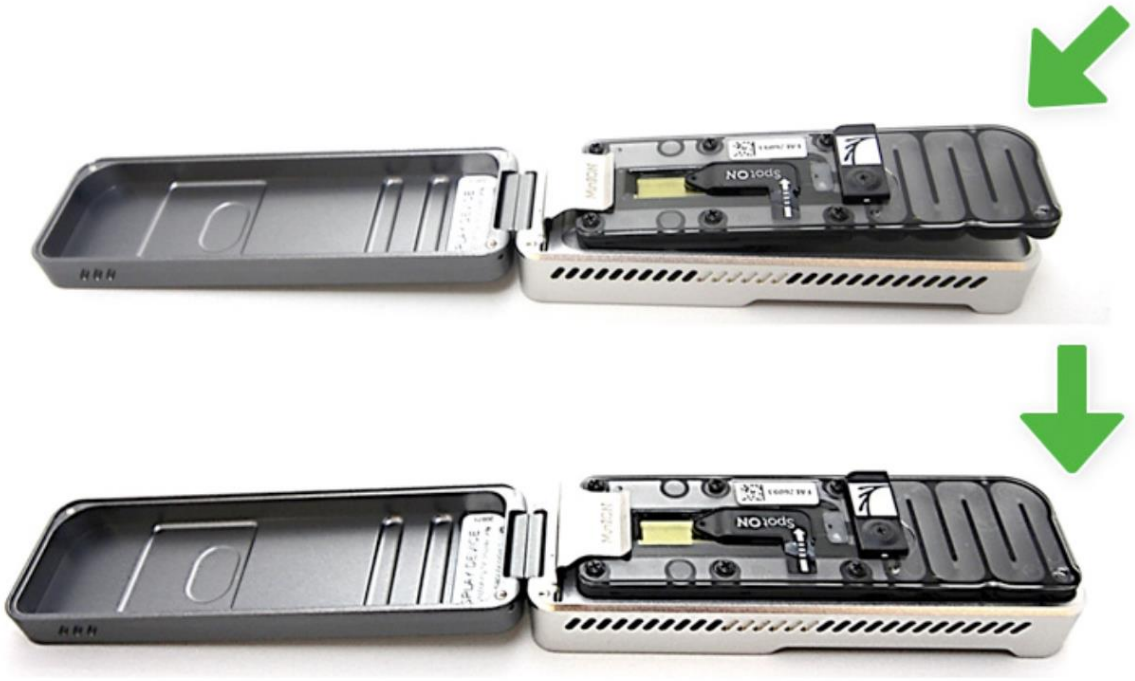

Рис. 7. Загрузка проточной ячейки в секвенатор

3. Сдвиньте крышку порта заливки по часовой стрелке, чтобы открыть его, как показано на рис. 8.

Рис. 8. Открытие порта заливки.

4. Установите пипетку P1000 на 200 мкл. Вставьте наконечник в порт заливки и поворачивайте колесо регулятора объема, пока шкала не покажет 220-230 мкл или пока вы не увидите небольшой объем буфера, поступающего в наконечник пипетки (рис. 9).

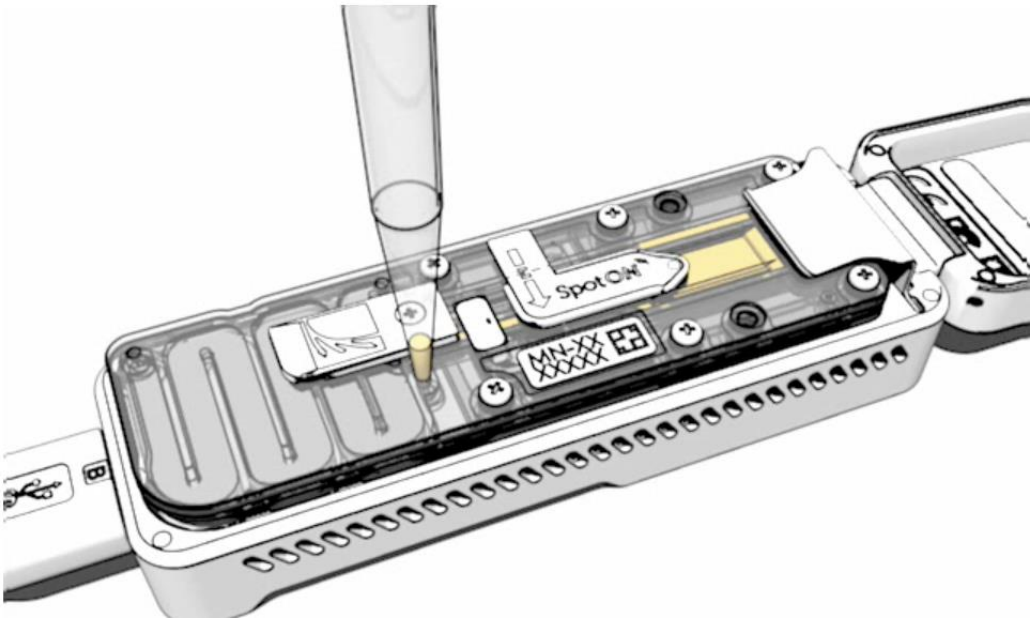

Рис. 9. Открытие порта заливки.

5. Приготовьте смесь для заливки проточной кюветы. Для этого добавьте 30 мкл размороженного и перемешанного Flush Tether (FLT) непосредственно в пробирку с размороженым и перемешанным Flush Buffer (FB) и перемешайте на вортексе при комнатной температуре.

6. Загрузите 800 мкл заливочной смеси в проточную кювету через заливной порт, избегая попадания пузырьков воздуха. Инкубируйте 5 минут.

7. За это время подготовьте библиотеку к загрузке. Для этого тщательно перемешайте содержимое загрузочных шариков (LB) с помощью пипетки.

   Пробирка LB содержит суспензию шариков. Эти шарики оседают очень быстро. Очень важно, чтобы они смешивались непосредственно перед использованием.

8. В новой пробирке подготовьте библиотеку к загрузке следующим образом:

Реагент	**Объем**
Буфер секвенирования (SQB)	37,5 мкл
Загрузочные шарики (LB)	25,5 мкл
Библиотека ДНК	12 мкл
Общий объем	**75 мкл**

9. Завершите заправку проточной кюветы: аккуратно поднимите крышку порта для образцов SpotON, чтобы сделать порт для образцов SpotON доступным. Загрузите 200 мкл заливочной смеси в проточную кювету через порт заливки (НЕ порт SpotON), избегая попадания пузырьков воздуха.

10. Аккуратно перемешайте подготовленную библиотеку пипеткой вверх и вниз непосредственно перед загрузкой. Добавьте по каплям 75 мкл образца в проточную кювету через порт для образцов SpotON (рис. 10). Убедитесь, что каждая капля поступает в порт, прежде чем добавлять следующую.

11. Аккуратно закройте крышку порта для образцов SpotON, убедившись, что пробка входит в порт SpotON. Закройте порт заливки и установите на место крышку секвенатора MinION Mk1B.

    Видеоматериал по активации ячейки и загрузке библиотеки доступен на сайте https://nanoporetech.com/.

12. Запустите секвенирование с помощью программного обеспечения MinKNOW, которое будет собирать необработанные данные с устройства и преобразовывать их в чтения.

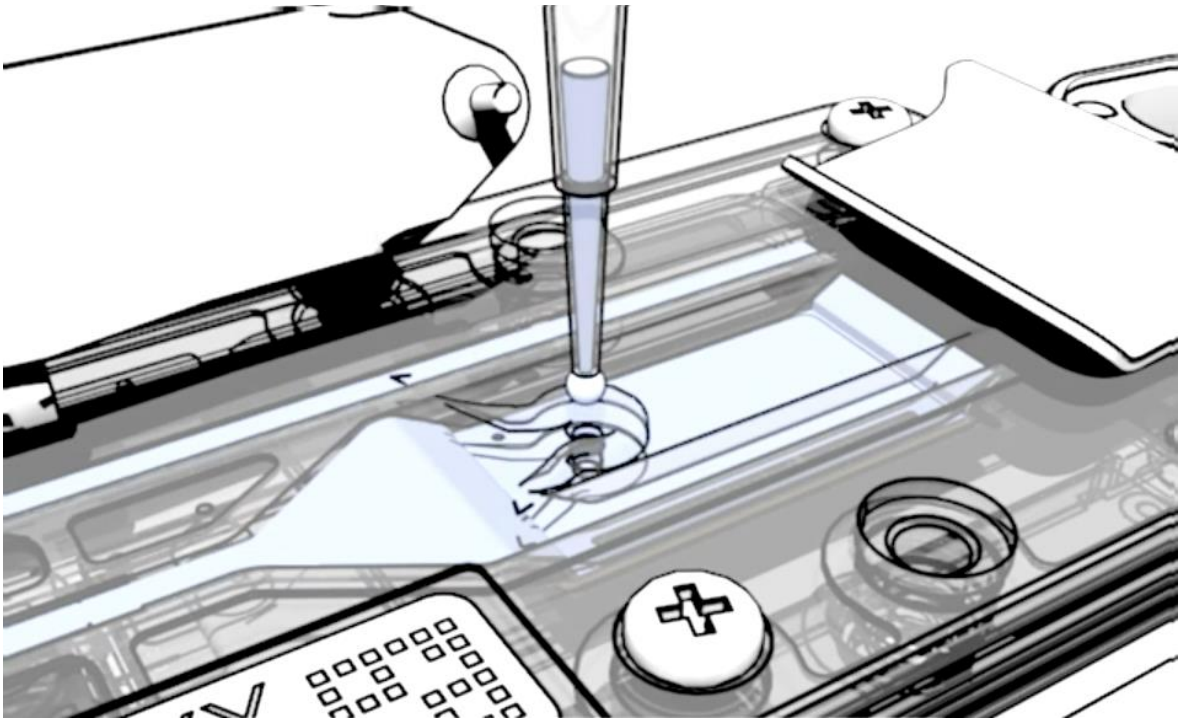

Рис. 10. Загрузка библиотеки в ячейку через порт SpotON.

4. АНАЛИЗ ДАННЫХ

Секвенирование может продолжаться до 72 часов. Программное обеспечение в реальном времени отслеживает количество оставшихся активных пор (Рис. 11). Количество полученных данных будет зависеть от длительности работы прибора, используемых наборов и качества подготовленной библиотеки.

Рис. 11. Иллюстрация работы пор на ячейке.
А - в начале секвенирования; Б - после нескольких часов секвенирования. Светло-зеленые квадратики - секвенирующие поры; темно-зеленые - готовые к секвенированию, но не секвенирующие поры; желтые - поры, секвенирующие адаптерную последовательность; светло-серые - поры, недоступные для секвенирования. Количество секвенирующих пор оценивается в режиме реального времени.

В режиме реального времени можно отслеживать ряд параметров секверования, включая количество прочтений и объем полученных данных, то есть выход секвенирования (рис. 12).

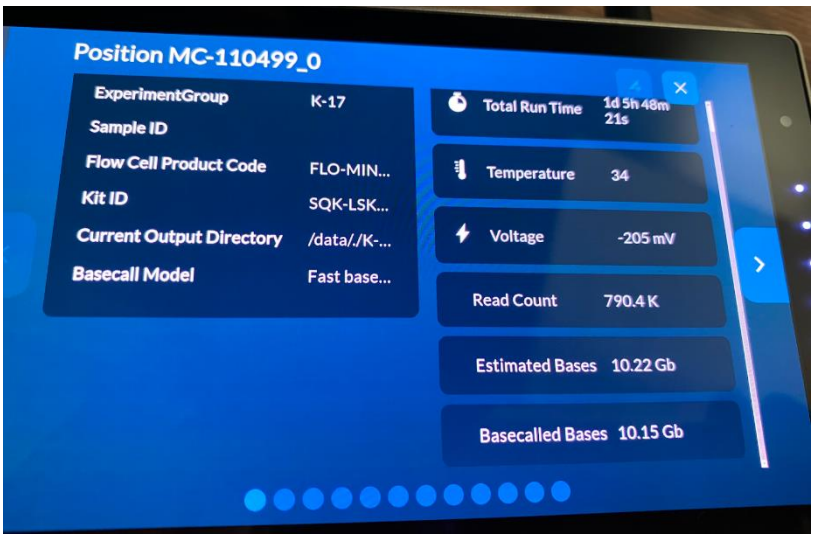

Рис. 12. Параметры, которые оцениваются в режиме реального времени в процессе секвенирования. Правая колонка (сверху вниз) - длительность секвенирования, температура ячейки, подаваемое напряжение. Количество чтений, количество полученных данных (млрд. п. н.).

Также в режиме реального времени можно отслеживать длину прочтений. На рис. 13 представлена пример гистограммы распределения длины прочтений в запуске. Ключевым параметром секвенирования является N50. N50 это такая минимальная длина прочтения, что прочтения с длинами большими или равными ей покрывают 50% генома.

Рис. 13. Гистограмма распределения длин прочтений. В режиме реального времени оценивается распределение длин чтений и значение N50 для данных, полученных в текущий момент.

Сырые данные секвенирования — прямая регистрация изменений ионного тока при прохождении нити ДНК через поры, которые обрабатываются программным обеспечением MinKNOW (https://nanoporetech.com/). MinKNOW также обрабатывает сигнал в «прочтения», каждое из которых соответствует одному фрагменту ДНК. Программа MinKNOW регистрирует и сохраняет чтения в формате fast5. Первичные прочтения необходимо перевести в последовательность нуклеотидов в ходе процедуры «бейс-коллинг» (от англ. base-calling). Специальное программное обеспечение Guppy basecaller (https://nanoporetech.com/) позволяет преобразовывать необработанные данные в канонические базы ДНК. Результаты преобразуется в формат FASTQ, который по умолчанию содержит 4000 прочтений на файл.

Дальнейший анализ данных может быть выполнен на платформе EPI2ME (https://labs.epi2me.io/). Платформа EPI2ME — это облачный сервис анализа данных, разработанный Metricor Ltd., дочерней компанией Oxford Nanopore Technologies. Платформа EPI2ME предлагает ряд рабочих процессов анализа. Анализ не требует дополнительного оборудования или вычислительной мощности и предоставляет простой для интерпретации отчет с результатами.
Также исследовательское подразделение Oxford Nanopore Technologies создало ряд инструментов анализа, которые доступны в репозитории Oxford Nanopore GitHub (https://github.com/nanoporetech). Инструменты предназначены для опытных пользователей и содержат инструкции по установке и запуску программного обеспечения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Сайт Oxford Nanopore Technologies [Электронный ресурс] // Oxford Nanopore Technologies plc. – Режим доступа: https://nanoporetech.com/applications/dna-nanopore-sequencing, свободный.
2. Научно-популярный сайт Биомолекула [Электронный ресурс] // Биомолекула – Режим доступа: https://biomolecula.ru/articles/nanoporovoe-sekvenirovanie-na-poroge-tretei-genomnoi-revoliutsii, свободный.
3. Sambrook J. and Russel D. Molecular cloning: a laboratory manual, 3nd ed. (v.1), Cold Spring Harbor Lab. Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001
4. Сайт компании Circulomic [Электронный ресурс] // Circulomic – Режим доступа: https://docs.wixstatic.com/ugd/5518db_411fba3c26c14b0189d33e9ade1da96f.pdf, свободный.
5. Репозиторий GitHub [Электронный ресурс] // Репозиторий GitHub Oxford Nanopore Technologies – Режим доступа: https://github.com/nanoporetech, свободный.
6. Сайт Oxford Nanopore Technologies [Электронный ресурс] // Oxford Nanopore Technologies plc. – Режим доступа: https://nanoporetech.com, после регистрации.

ДЛЯ ЗАМЕТОК

Гоголева Наталья Евгеньевна

Шагимарданова Елена Ильясовна

ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ И НАНОПОРОВОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ

Учебно-методическое пособие

Типография «Юкард»
420100, Казань, Проспект Победы, 144а
Тел. +7 (843) 202 37 07
Печать цифровая. Бумага офсетная
Формат 60x90/16
Тираж 100 экз.
Заказ № 5638
Подписано в печать 22.04.2022