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. Нургалиев
«___» _____ 2015 г.

МЕТОДИКА ЭКЗОМНОГО ОБОГАЩЕНИЯ ДНК НА ОСНОВЕ ГИБРИДИЗАЦИИ

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 экзомного обогащения ДНК человека для последующего анализа с использованием секвенаторов нового поколения Illumina.

2. Принцип методики

Методика основана на обогащении кодирующей части генома человека (экзомов) при использовании гибридизационных зондов (коротких фрагментов ДНК, комплементарных к участкам экзомов) с последующим секвенированием.

3. Оборудование и материалы

3.1. Оборудование

3.1.1. Секвенатор нового поколения Illumina NextSeq 500 (Illumina, США)

3.1.2. Автоматические пипетки Eppendorf (Eppendorf, Германия)

3.1.3. Автоматические пипетки Ленпипет (ThermoFisherScientific, США)

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

3.1.5. Настольная центрифуга MiniSpinPlus (Eppendorf, США

3.1.6. Амплификатор Veriti® 96-well Thermal Cycler (Life Technologies, США)

3.1.7. Реал-тайм ПЦР платформа LightCycler® 480 (Roche, Швейцария)

3.1.8. Магнитный сепаратор DynaMag(Life Technologies, США)

3.1.9. Флуориметр Qubit® 2.0 Fluorometer(Life Technologies, США)

3.1.10. Микрофлюидная система Agilent® 2100 Bioanalyzer® (Agilent Technologies, США)

3.1.11. Вакуумный концентратор Eppendorf Concentrator plus (Eppendorf, Германия)

3.1.12. Устройство для фрагментации Covaris S220 Ultra Sonicato (Covaris, США)

3.1.13. ШтативдлямагнитнойсепарацииDynaMag-2 Magnet (Life Technologies, США)

3.1.14. Термостат Термит (ДНК-технология, Россия)

3.1.15. Спектрофотометр Nano Drop 2000 (Thermo Scientific, США)

3.2. Материалы

3.2.1. Набор реагентов KAPA Library Preparation Kit (KapaBiosystems.,США)

3.2.2. Набор SeqCapAdapter KitA (Roche, Швейцария)

3.2.3. Набор SeqCapEZHE-Oligo KitA(Roche, Швейцария)

3.2.4. Набор SeqCapEZAccessory Kitv2 (Roche, Швейцария)

3.2.5. Набор SeqCap EZ Hybridization and Wash Kit (Roche, Швейцария)

3.2.6. Набор NextSeq 500/550 Kit(Illumina, США)

3.2.7. Магнитные частицы, покрытые стрептавидином, SeqCap EZ Pure Capture Bead Kit (Roche, Швейцария)

3.2.8. Пленка MicroAmp® Clear Adhesive Film (Life Technologies, США)

3.2.9. Плашка LightCycler® 480 Multiwell Plate 96 (Roche, Швейцария)

3.2.10. Реакционная смесь LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche, Швейцария)

3.2.11. Магнитные частицы Agencourt® AMPure® XP Kit (Beckman Coulter)

3.2.12. Деионизированная вода без нуклеазной активности Nuclease-freewater (LifeTechnologies, США)

3.2.13. Набор QubitiTdsDNA HS Assay Kit (Invitrogen, США)

3.2.14. Набор QubitiTdsDNA BR Assay Kit (Invitrogen, США)

3.2.15. Набор Agilent® DNA 1000 Kit (Agilent Technologies, США)

3.2.16. Пробирки microTUBE AFA для фрагментации на Covaris System (Covaris, Inc, США).

3.2.17. Пробирки Qubit Assay Tubes (Invitrogen, США)

3.2.18. Пробирки LoBind tubes 1,5 мл (Eppendorf, Германия)

3.2.19. Пробирки 0,2 мл PCR-tube (Eppendorf, Германия)

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

3.2.21. Маркер молекулярного веса100 bp + 1.5 Kb (Сибэнзим, Россия)

3.2.22. Интеркалирующий краситель GelRed (Biotium, США)

3.2.23. Химические реактивы Sigma (США)

4. Методика экзомного анализа ДНК человека на основе высокопроизводительного секвенирования с при обогащении методом гибридизации

4.1. Конструирование библиотеки фрагментов ДНК для секвенирования с использованием секвенатора Illumina NextSeq 500

Для подготовки библиотеки требуется 100-1000 нг недеградированной геномной ДНК (260/280 не менее 1.8). Концентрацию ДНК рекомендуется оценивать с помощью флуориметра Qubit (Invitrogen, США). На первом этапе подготовки ДНК проводят механическую фрагментацию образца ДНК в объеме 52,5 мкл ТЕ-буфера (10 мМ Трис-HCl pH 8,0, 1 мМ ЭДТА) на фрагменты со средним размером 180-220 bp методом обработки ультразвуком с помощью прибора Covaris S220 System. Резервуар прибора

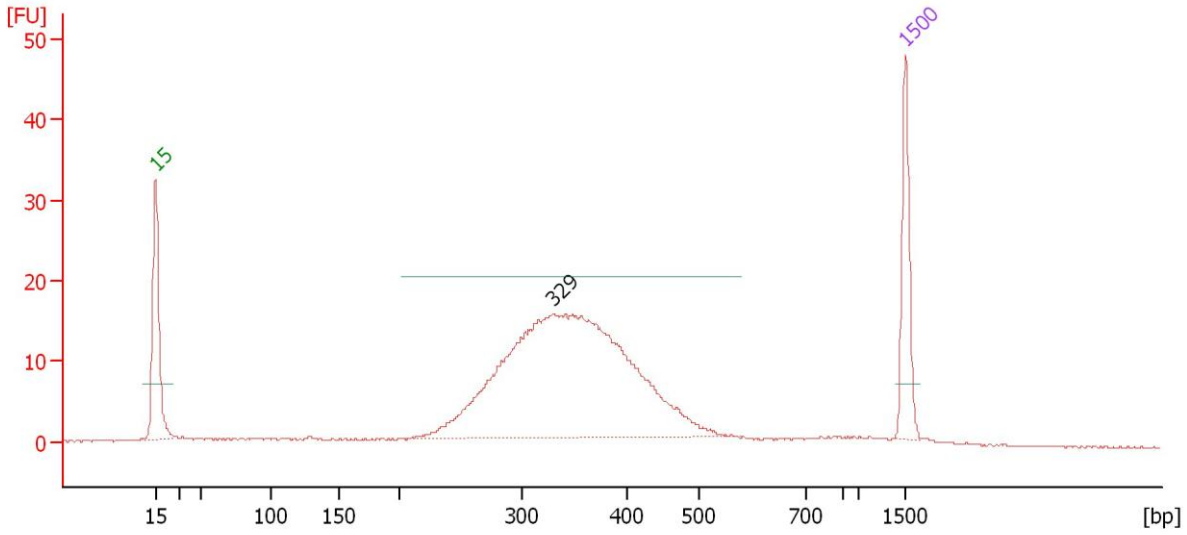
заполняют свежей деионизированной водой, затем прибор включают и проводят охлаждение до 5˚С, а также дегазацию воды не менее чем за 30 минут до начала проведения фрагментации ДНК. В пробирки MicroTube добавляют 50 мкл образца, стараясь предотвратить образование пузырей. Пробирку подвергают воздействию ультразвука при параметрах, обеспечивающих образование фрагментов необходимогодиапазона длин: интенсивность 175, мощность 10%, время воздействия 120 секунд. После завершения процесса пробирку извлекают и переносят образец ДНК в 1,5 мл пробирку LoBind. Фрагментированную ДНК подвергают дальнейшим манипуляциям либо замораживают и хранят при -20°С. Для оценки фрагментации ДНК по размеру в заданном диапазоне длин готовят 2% агарозный гель на однократном ТАЕ-буфере (трис-ацетат 40мМ, ЭДТА 1мМ) с интеркалирующем красителем GelRed. Процедуру электрофореза осуществляют при напряженности электрического поля 5 В/см геля. Оценка длины фрагментов осуществляется относительно коммерческого маркера 100 bp + 1.5 Kb (Сибэнзим, Россия). Фрагментация считается полноценной в том случае, если полностью исчезает высокомолекулярная фракция исходного образца, а также размер фрагментов укладывается в диапазон от 50 до 500 пар нуклеотидов с преобладанием в области 100-200 пар нуклеотидов.

Далее процедуру подготовки ДНК-библиотеки проводят с помощью набора KAPA Library Preparation Kit (Roche, Швейцария) согласно инструкциям производителя. Все манипуляции проводятся на магнитных частицах AMPure XP beads. Далее проводят двухэтапный отбор фрагментов ДНК в диапазоне длин 180-220 пар нуклеотидов путем добавления раствора для size selection (PEG/NaClSPRISolution) с целью удаления из образца сначала крупных фрагментов длиной более 450 пар нуклеотидов, а затем фрагментов длиной менее 250 пар нуклеотидов. Связанные с магнитными частицами фрагменты необходимого диапазона длин промывают 3 раза 80% этанолом, после чего ДНК-фрагменты элюируют буфером (Tris-HCl 10 mM, pH 8.0) или деионизированной водой. Концентрацию библиотеки измеряют с помощью флуориметра Qubit (Invitrogen, США) с использованием Quant-iTdsDNAHS Assay Kit (Invitrogen, США).

Готовую библиотеку амплифицируют с использованием праймеров Pre-LM-PCR Oligos, входящих в набор SeqCapAdapter kit, согласно протоколу производителя. Полученную после амплификации библиотеку очищают с использованием магнитных частиц AMPureXP Beads. Для этого добавляют 1,8 объема частиц к образцу, а затем проводят тройную промывку связавшейся с магнитными частицами библиотеки 200 мкл 80% этанола, после чего элюируют ДНК-фрагменты с магнитных частиц 50 мкл

деионизированной воды. Количественную оценку осуществляют путем измерения коннцентрацию библиотеки с помощью флуориметра Qubit (Invitrogen, США) с использованием Quant-iTdsDNAHS Assay Kit (Invitrogen, США). Проводят качественную оценку очищенной библиотеки на приборeAgilent 2100 Bioanalyzer с использованием чипа Agilent Bioanalyzer DNA 1000 chip. Библиотека считается качественной, если фрагменты ДНК находятся в диапазоне длин от 150 до 500 пар нуклеотидов.

Пример распределения длин библиотеки фрагментов ДНК, пригодной для дальнейшего связывания со специфическими зондами:



Сигнал в отрицательном контроле реакции амплификации должен отсутствовать. Наличие сигнала в отрицательном контроле в диапазоне 150-400 пар нуклеотидов указывает на контаминацию библиотеки в процессе амплификации. Наличие сигнала в диапазоне менее 150 пар нуклеотидов не является признаком контаминации образца.

4.2.Процедура связывания библиотеки фрагментов со специфическими зондами

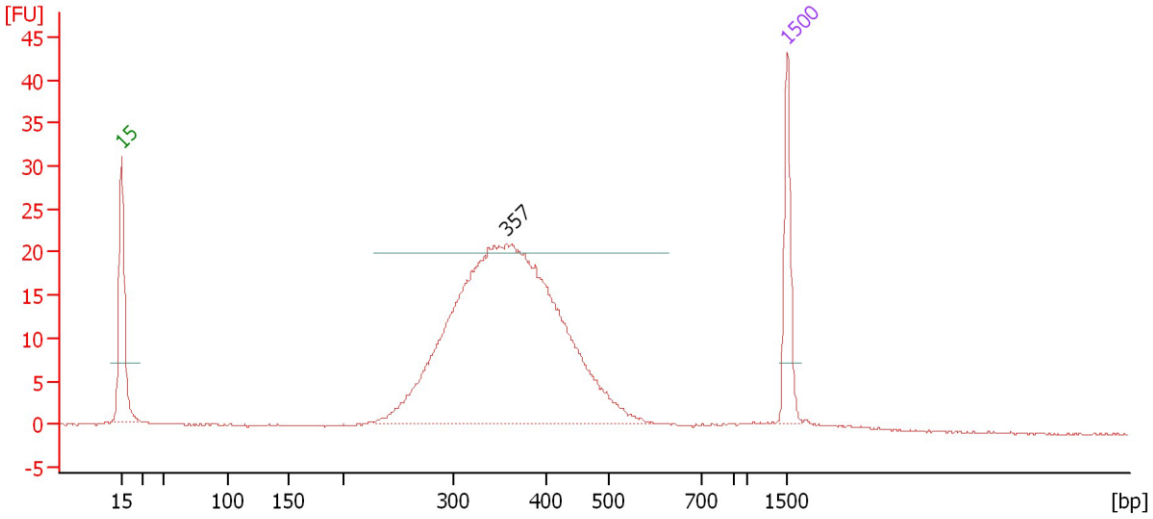
Гибридизацию набора проб, содержащих биотиновую метку, с известными ДНК-кодирующими последовательностями (SeqCap EZ probepool) осуществляют согласно рекомендациям производителя. В реакционную смесь добавляют 2000 pmol пула олигонуклеотидов, блокирующих адаптеры, 5 мкг COTHumanDNA для блокирования повторяющихся последовательностей образца и предотвращения неспецифической гибридизации, зонды для гибридизации SeqCapEZ Probe pool и 1 мкг ДНК-библиотеки. Смесь высушивают с помощью вакуумного концентратора при температуре 60°C (около 30 минут), предварительно проткнув крышку эппендорфа стерильной иглой.

Гибридизацию осуществляют в амплификаторе при температуре 47°Св течение 16-20 часов.

По окончании гибридизации осуществляют отбор фрагментов библиотеки с помощью магнитных частиц, покрытых стрептавидином, SeqCapPureCaptureBead Kit и промывку с помощью набора SeqCapHybridizationand Wash Kit согласно инструкции производителя. Все процедуры осуществляют в амплификаторе при температуре +47˚С.

Проводят амплификацию(обогащение) с помощью набора праймеров Post-LM-PCR Oligos и очистку с помощью магнитных частиц AMPureXP beads библиотеки фрагментов, полученных в результате гибридизации со специфическими зондами. С помощью спектрофотометра NanoDrop измеряем соотношение 260/280, значение которого должно находиться в диапазоне 1.7-2.0. Если значения отличаются от указанных, то следует провести дополнительную очистку образца с помощью магнитных частиц AMPureXPbeads. Амплификация в реакции отрицательного контроля должна отсутствовать. Наличие сигнала в отрицательном контроле указывает на контаминацию. Осуществляют качественный анализ полученной обогащенной библиотеки с помощью прибора Agilent 2100 Bioanalyzer с использованием чипа AgilentBioanalyzerDNA 1000 chip. Средний диапазон длин библиотеки должен находиться в пределах 150-500 пар нуклеотидов.

Пример распределения длин обогащенной ДНК-библиотеки:



Количественную оценку осуществляют с помощью постановки ПЦР в реальном времени с использованием прибора LightCycler® 480 (Roche, Швейцария). Для этого разводят до концентрации 5 нг/мкл в объеме 100 мкл деионизированной воды геномную ДНК, служащую положительным контролем, амплифицированную фрагментную библиотеку и обогащенную библиотеку, полученную в результате гибридизации с

зондами.Для каждого образца готовят реакционную смесь в трех повторах. Последовательности праймеров для обогащения и длина их продуктов представлены в таблице:

Название праймера	Последовательность праймера(5′ → 3′)	Длина продукта
NSC-0237	F: CGCATTCCTCATCCCAGTATG R: AAAGGACTTGGTGCAGAGTTCAG	80 bp
NSC-0247	F: CCCACCGCCTTCGACAT R: CCTGCTTACTGTGGGCTCTTG	74 bp
NSC-0268	F: CTCGCTTAACCAGACTCATCTACTGT R: ACTTGGCTCAGCTGTATGAAGGT	75 bp
NSC-0272	F: CAGCCCCAGCTCAGGTACAG R: ATGATGCGAGTGCTGATGATG	71 bp

По окончании реакции амплификации рассчитывают значение Cp (crossing point) – показатель, указывающий на цикл реакции амплификации, сигнал флуоресценции которого превышает фоновый сигнал флуоресценции в лунке. Значение данного показателя варьирует в зависимости от начальной концентрации ДНК в реакционной смеси. Чем ниже значение Cp, тем выше концентрация ДНК в реакции. Сигнал в реакции отрицательного контроля должен отсутствовать. Наличие сигнала в отрицательном контроле указывает на контаминацию ПЦР.

Рассчитав среднее значение показателя Cp для каждого образца (в трех повторах), подсчитывают значение показателя ΔCp по формуле:

ΔCp = Среднее Cp (амплифицированной библиотеки) - Среднее Cp (обогащенной библиотеки)

На основе полученного значения показателя ΔCp рассчитывают показатель обогащения согласно формуле

Обогащение = $E^{\Delta Cp}$, где E – эффективность амплификации

В зависимости от длины, значение показателя обогащения варьирует от 75-кратного для 40 мегабаз (Мб) участков экзонов ДНК человека до 12000-кратного для 250 килобаз (кб) участков экзонов ДНК человека.

4.3.Разведение библиотеки для проведения процедуры секвенирования

К 5 мкл библиотеки с начальной концентрацией 4 наномоль добавляют равный объем 0.2N NaOH. Перемешивают на вортексе при 280 g в течение 1 минуты, инкубируют 5 минут при комнатной температуре, затем добавляют 5 мкл 200 mMTris-HCl, pH 7 и снова перемешивают на вортексе при 280 g в течение 1 минуты.К полученной денатурированной библиотеке добавляют 985 мкл предварительно охлажденного буфера для гибридизации HT1 и перемешивают на вортексе при 280 g в течение 1 минуты. В результате всех манипуляций получают 20 пикомоль библиотеки, которую разбавляют до конечной концентрации 1,8 пикомоль, добавив к 117 мкл библиотеки 1183 мкл буфера для гибридизации HT1. Таким образом, получают 1.8 пикомоль библиотеки в объеме 1.3 мл. Аналогичные манипуляции осуществляют для контрольной библиотеки PhiX. Для разведения до 4 наномоль к 10 мкл контрольной библиотеки с концентрацией 10 наномоль добавляют 15 мкл ресуспендирующего буфера RSB, перемешивают на вортексе. Затем разбавляют и денатурируют контрольную библиотеку до 20 пикомоль способом, описанным выше. После чего смешивают 1.2 мкл денатурированной и разведенной контрольной библиотеки PhiX и 1299 мкл обогащенной экзомной библиотеки. Готовую смесь помещают в картридж для реагентов и проводят секвенирование согласно инструкциям производителя.

5. Список использованных источников

1. SeqCap EZ Library SR User’s Guide, v5.1, September 2015.
2. NextSeq System Denature and Dilute Guide, October 2015 (# 15048776 v01)
3. Rui Chen. Whole-Exome Enrichment with the Roche NimbleGenSeqCap EZ Exome Library SR Platform /Rui Chen, HoguneIm, and Michael Snyder // Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2015.