

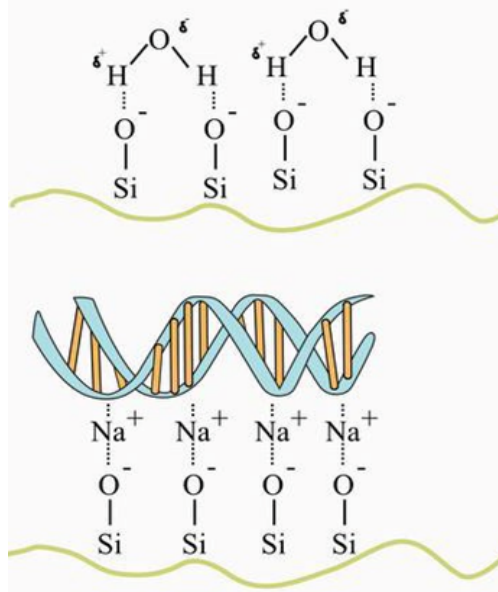
**День 1 (04.02.24)**

Студенты: Лыков К.А., Чупов Е.А.

Глобальная цель: Произвести секвенирование генома человека и биоинформатически обработать данные.

**Рабочий образец: образец 006 ДНК человека**

- RSB – буфер (содержит Na для лучшей связи ДНК с магн. частицами)
- SPB – магнит. частицы с силикатной мембраной( $\text{SiO}_2$ ).
  - SPB соединятся с ДНК по схеме: частица – мембрана( $\text{Si} - \text{O}$ ) – Na (из RSB) – 5' ДНК.



- ERP (полимераза T4) – полимеразы, обладающая экзонуклеазной активностью 3'-5' и эндонуклеазной(исправляющей ошибки достройки) 5'-3'. Благодаря этим двум активностям, ферменты убрал липкий концы и оставляет тупые, это важно для так как ферменты ATL может добавить аденин к 3' концу, если ему не мешает липкий 5' конец.
1. Внесли 52,5 мкл образца в пробирки Covaris. Произвели фрагментирование образцов на фрагменты длиной 300 нуклеотидов, для этого использовали следующую программу(300bp\_microTUBE-50) на аппарате Covaris S220.
  2. Перелили в обычную пробирку 0,5 мл после сонификации с помощью пипетки.
  3. Добавляем буфер RSB.
  4. Используем ERP (40 мкл) с T4 ДНК полимеразой, благодаря экзонуклеазной активности она уберет липкий 5' конец и оставляет тупой 3' конец, это позволит ATL, добавить аденин к 3' концу. Для того чтобы достроить короткие участки ДНК.
  5. Взбалтываем SPB (105 мкл) в вортексе, с помощью пипетки переводим в пробирку. Разбавляем в  $\text{H}_2\text{O}$  (72 мкл). Перемешиваем в центрифуге (коротким нажатием).
  6. Добавляем разведённый SPB к образцу. На 5 минут на столе оставляем.
  7. 5 мин на магнитном штативе (helicon). С помощью магнитного штатива отводим магнитные частицы со дна и забираем в пипетку чистый образец.
  8. В новую пробирку отбираем 30 мкл не разведённый SPB, добавляем очищенный образец.
  9. Разведённый SPB для отбора меньших фрагментов (SPB забирает большие фрагменты) за счёт большего пространства. SPB используется как фильтр по длине фрагментов. Отбираем жидкость с небольшими фрагментами.
  10. Затем используем не разведённый SPB для отбора целевых фрагментов (увеличиваем концентрацию ДНК).
  11. Два раза промываем спиртом для того, чтобы смыть все лишние орг. молекул по схеме:
    - 200 мкл спирта вносим в пробирку на 30 сек
    - Отбираем спирт
    - 200 мкл спирта вносим в пробирку на 30 сек
    - Отбираем спирт
    - Откручиваем пробирку на вортексе и возвращаем ее в магнитный штатив
    - Ждём 2 мин и носиком на 10 мкл отбираем оставшийся спирт.
  12. Ждём пока высохнут остатки спирта, до матовости магнитных частиц.
  13. Дальше добавляем буфер 20 мкл, чтобы разбавить уже ДНК.
  14. 2 мин на столе.
  15. 5 мин, на магнитном штативе.

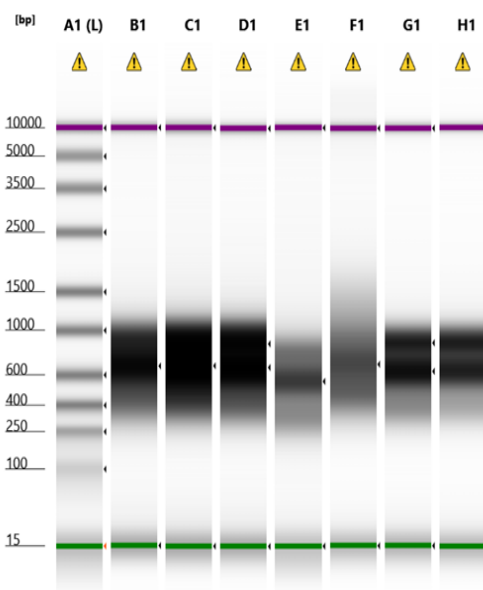
**День 2 (05.02.24)**

Цель: из подготовленного вчера образца создать библиотеку (добавляем адаптеры с индексами)

**Номер адаптера: D4**

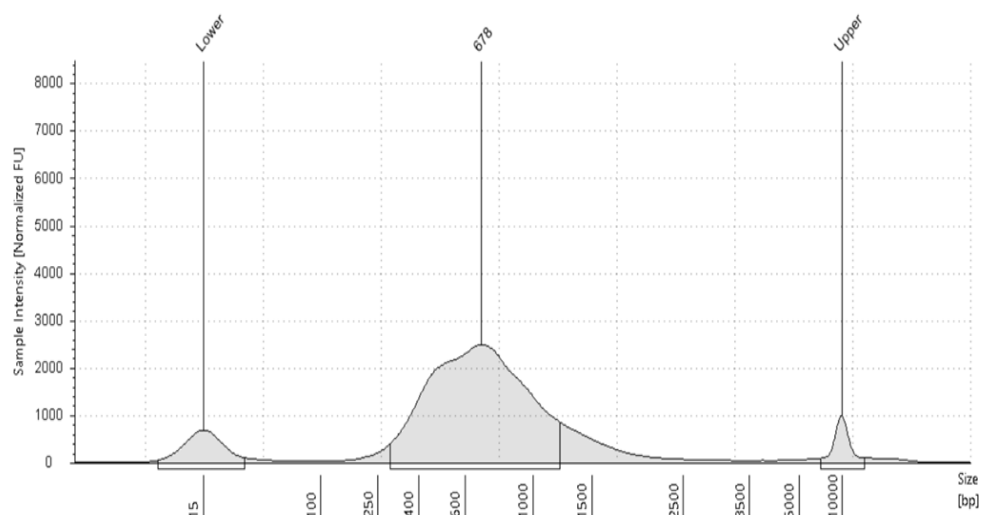
1. Добавляем с помощью ATL к 3' аденин, чтобы правильно прикрепить адаптеры содержащие тимин со стороны 5'. Индекс 8-10 нуклеотидов. На конец адаптера садится праймер.
2. Перемешиваем ATL на вортексе.
3. Инкубируем 30 мин 37 гр, затем разрушаем фермент после присоединения аденина резким повышением температуры до 70 гр, 5 мин.
4. Вносим 2,5 мкл адаптеров и RSB в образец после инкубирования.
5. RSB создаёт благоприятную среду и добавляет пространства в раствор для снижения концентрации, для удачного прикрепления адаптеров к ДНК.
6. Добавляем 2,5 мкл лигазы для сшивки адаптеров с ДНК.
7. Перемешиваем образец с адаптерами.
8. Инкубируем 10 мин, 30 гр.
9. После инкубации вносим 5 мкл STL (буфер) для инактивации лигазы. После помещаем образец в лёд. Получили библиотеку. Но в ней могут находиться не пришитые адаптеры, которые будут занимать лишнее место в секвенаторе.
10. Проводим очистку образца:
  1. Осаживаем и перемешиваем SPB на вортексе.

2. Вносим такой же объем SPB (42,5 мкл) в библиотеку.
3. Перемешиваем и инкубируем на столе 5 мин.
4. Ставим на 5 мин на магнитный штатив крышечкой к нему, приоткрывая совсем чуть-чуть крышечку.
5. Отбираем жидкость. Промываем спиртом по той же схеме, что и вчера:
  - 200 мкл спирта вносим в пробирку на 30 сек
  - 200 мкл спирта вносим в пробирку на 30 сек
  - Отбираем спирт
  - Откручиваем пробирку на вортексе и возвращаем ее в магнитный штатив
  - Ждём 2 мин и носиком на 10 мкл отбираем оставшийся спирт.
6. Ждём до того пока частицы не станут матовыми. Если они перестанут, то произойдет отделение ДНК от силикатной мембраны.
7. Затем добавляем 52,5 мкл RSB для придания объема, чтобы было легче отделить ДНК с адаптерами от магнитных частиц. Снимаем с магнитной подставки и перемешиваем на вортексе. Оставляем на столе на 2 мин.
8. Затем на магнитный штатив, 5 мин.
9. Переводим жидкость в новую пробирку с помощью пипетки.
10. Повторяем очистку второй раз, для надёжности.
11. Вносим 22,5 мкл RSB.
12. На вортексе библиотеку осадили, перемешали, осадили. 2 мин на столе.
13. Осадили, на магнитный штатив, до матовости частиц.
14. Перевели жидкость в новую частицу. Получили конечную библиотеку, несём в ЛК.
15. Проводим электрофорез на приборе Agilent Tape Station 4150.
16. Для этого сначала нужно подготовить библиотеку в стрипе:
  - Добавляем буфер (1,5 мкл) в каждый стрип.
  - Вводи линейку только в первую лунку, чтобы относительно нее замерять скорость.
  - Добавляем 1,5 мкл образца в соответствующую лунку.
  - Закрываем стрип.
  - Перемешиваем в шейкере.
17. Потом нужно поместить стрип в отдел для стрима, и поместить картридж с гелем (каждая лунка одноразовая).
18. Даём названия образцам через программу. Проводим электрофорез на аппарате. Примечание: ДНК разделяются по длине, это определяется по скорости перемещения фрагментов в геле. Меньшие фрагменты ДНК перемещаются быстрее, чем большие. Это происходит потому, что меньшим фрагментам легче пробираться через поры геля (обычно агарозного или полиакриламидного). Большие фрагменты испытывают большее сопротивление при движении через гель, поскольку они должны "протискиваться" сквозь поры, и, следовательно, движутся медленнее.
19. Результаты электрофореза:



Наш образец под маркером F1, как видно медиана длины соответствует 600 bp, что является успешным результатом. Более подробный график:

F1: 06



Lower, Upper это метки на графике получившиеся за счет буфера для помощи аппарату в определении длины последовательности ДНК. Пики отображают наиболее часто встречаемую длину в кластере. Исходя из этого точная средняя длина фрагмента = 678 bp.

### День 3 (06.02.24)

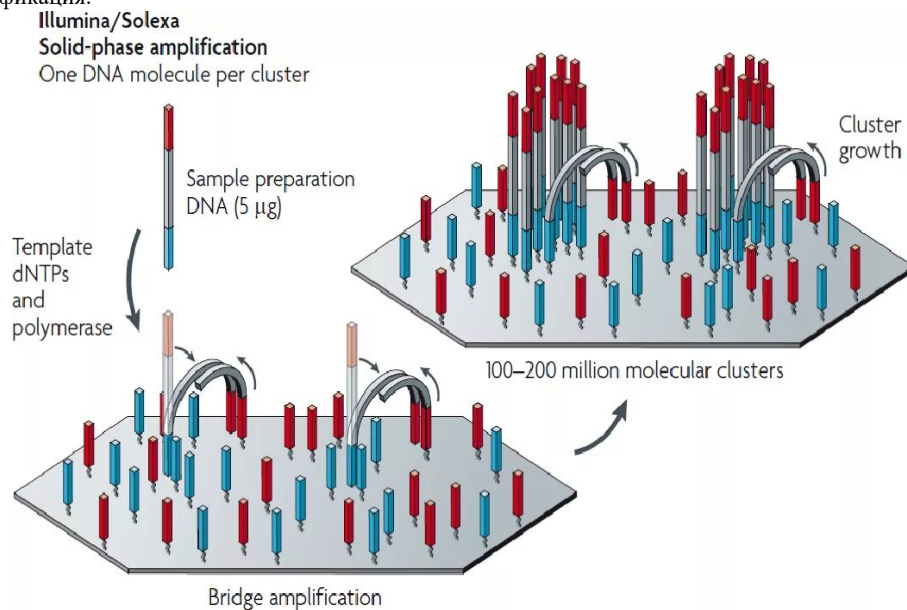
Цель: будем проводить ПЦР на библиотеке для увеличения количества исходных молекул ДНК.

#### Теоретическая часть

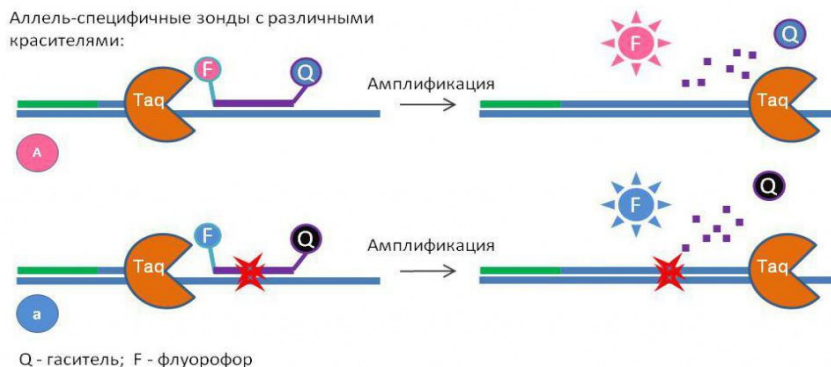
При ПЦР используется: полимеразы, праймеры (P5 (левый), P7 (правый)), праймерная области на адаптерах и метки, что сигнализируют о количестве ДНК.

Циклы ПЦР:

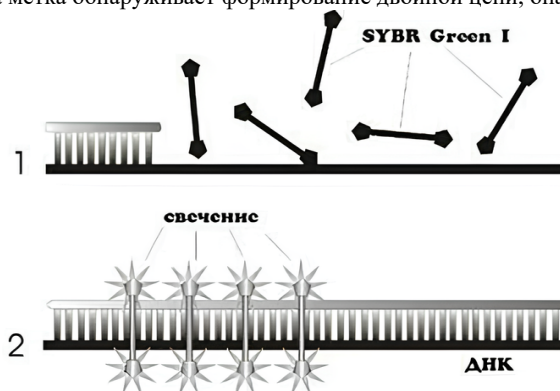
1. Денатурация цепи.
2. Мостиговая амплификация.



3. Потом по одному наращиванием нуклеотиды с помощью полимеразы. На каждом цикле присоединения нуклеотида: добавляем конкретные нуклеотиды, он либо подходит либо нет, потом смываем их.
4. Когда нарастили цепь до нужной длины - конец ПЦР. Примечание: все так же как и при секвенировании синтезом.
- Старый формат меток для ПЦР (зонд): используется зонд, который вставляется посередине. Зонд имеет флуорофор на одном из концов, который отсоединяется с излучением света от него когда полимеразы проходят через зонд (зонд разрушается).



- Новый формат (SYBR Green): когда метка обнаруживает формирование двойной цепи, она вставляется в ДНК и испускает свет.

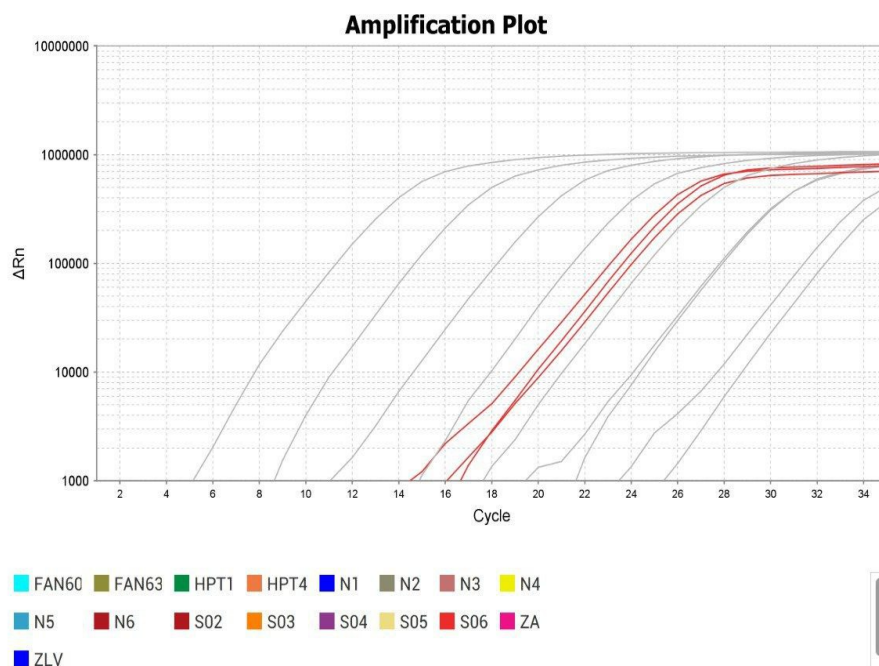


ПЦР позволит определить концентрацию ДНК. ПЦР будет проводиться для каждого образца. Секвенирование будет проводиться с общим пулом.

### Практическая часть

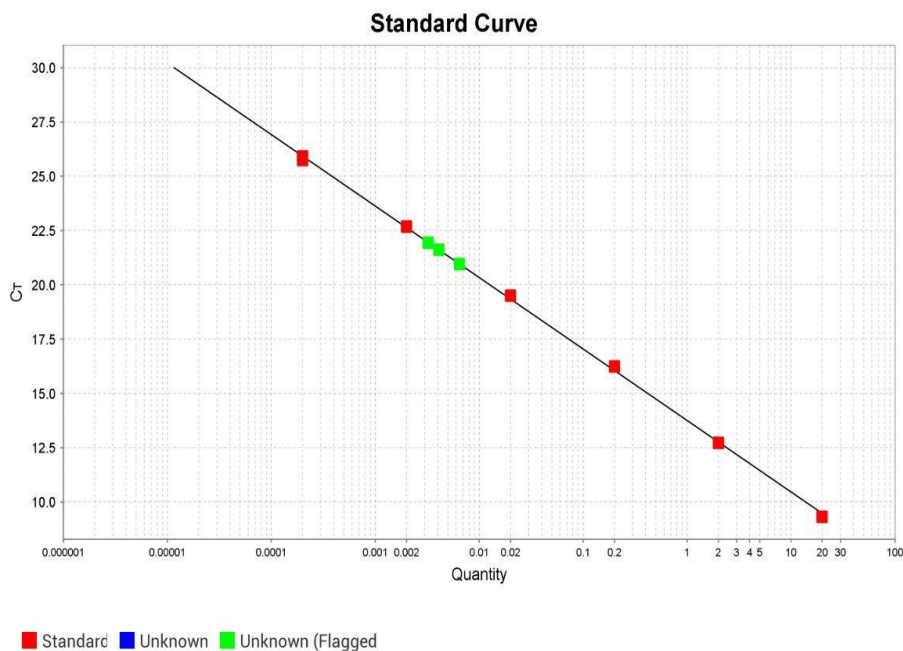
Нужно подготовить библиотеку к ПЦР, для этого понадобится:

- КАРА 2x (Полимераза, dNTP, SYBR Green, Mg<sup>2+</sup>, буфер, праймеры)
  - H<sub>2</sub>O
- Подготовим всего 4 пробирки для доз: 10, 100, 1000, 10000 разведений.
  - В 10 мы добавили 1 мкл изначальной библиотеки и 9 мкл H<sub>2</sub>O.
  - В каждую вводим по 9 мкл H<sub>2</sub>O и 1 мкл из прошлой дозировки и повторяем 4 раза (10, 100, 1000, 10000)
  - 15 сек на вортексе на каждой итерации.
  - В стрип вносим 13,5 мкл микса (КАРА + H<sub>2</sub>O) в каждую лунку стрипа.
  - В каждую лунку стрипа вносим 1,5 мкл ДНК 10000.
  - 10000 т.к. это стандарт для аппарата.
  - Заносим стрип в аппарат QuatStudio 3.
  - Результаты ПЦР:



На данном графике видно, что целевую ДНК получилось обнаружить начиная с 14-ого цикла. dRn - это изменение уровня флуоресценции в ходе ПЦР, и что логично он увеличивается с ростом циклов до определенного предела, говорящего о том, что

целевая ДНК дублирована.



По оси X отображается количество целевой в логарифмическом масштабе (log10). По Y у нас отображается цикл при котором достигается устойчивый сигнал флуоресценции, говорящий о достаточной амплификации ДНК.  
При V=1,5 мкл и разведении 10000:

$$\text{Среднее количество ДНК} = 10^{\frac{0.003+0.004+0.0065}{3}} = 10^{0.0045} = 1.014155 \text{ копий/мкл}$$

#### Расчет молярной массы библиотеки

Дано:

- V=1,5 мкл
- 10000 разведении
- Среднее количество ДНК = 1.014155 копий/мкл
- Средняя длина фрагмента = 678 bp
- Mbp(молярная масса одной пары) = 2 \* 330 г/моль = 660 г/моль.

Решение:

$$\text{Молярность библиотеки} = \frac{n_{\text{библиотеки}}}{V_{\text{библиотеки}}}$$

$$M(\text{молярная масса среднего фрагмента}) = 660 * 678 = 447480 \text{ г/моль}$$

$$n_{\text{ср}} (\text{количество копий}) = 1.014155 * 10^{-6} * 10000 = 1.014155 * 10^{-2} \text{ копий/л}$$

$$n_{\text{библиотеки}} = \frac{m}{M} = \frac{N}{NA}$$

$$m = \frac{n_{\text{ср}} * M}{NA} = \frac{1.014155 * 10^{-2} * 447480}{6.022 * 10^{23}} = 753,59 * 10^{-23} \text{ г/л}$$

$$\text{Молярность библиотеки} = \frac{m}{M} = \frac{753,59 * 10^{-23}}{447480} = 1.684 * 10^{-26} \text{ моль/л}$$

#### День 4

Цель: провести секвенирование на MiSeq

##### Теоритическая часть

Денатурация библиотеки с помощью NaOH + нагревание.

MiSeq проводит секвенирование синтезом.

В картридже имеются: праймеры, буферы разные типы, нуклеотиды меченые.

В ячейке имеются: ковер из олигонуклеотидов.

##### Практическая часть