

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНА УСТАНОВА  
“НАЦІОНАЛЬНИЙ ІНСТИТУТ ФТИЗІАТРІЇ І ПУЛЬМОНОЛОГІЇ  
ІМ. Ф. Г. ЯНОВСЬКОГО НАМН УКРАЇНИ”

РЕФЕРЕНС-ЛАБОРАТОРІЯ З МІКРОБІОЛОГІЧНОЇ ДІАГНОСТИКИ  
ТУБЕРКУЛЬОЗУ НАМН УКРАЇНИ

**СТАНДАРТНІ ОПЕРАЦІЙНІ ПРОЦЕДУРИ ДЛЯ  
ВИКОРИСТАННЯ ПРИ ПОВНОГЕНОМНОМУ  
СЕКВЕНУВАННІ M. TUBERCULOSIS НА ПЛАТФОРМІ  
Illumina MiSeq**

**НАВЧАЛЬНИЙ ПОСІБНИК**

КИЇВ 2024

**Розробник:**

Лабораторія мікробіології і біохімії ДУ «Національний інститут фтизіатрії і пульмонології ім. Ф. Г. Яновського НАМН України»;

Референс-лабораторія з мікробіологічної діагностики туберкульозу НАМН України.

**Автори:**

Ю. І. Фещенко – д-р мед. наук, професор, академік НАМН України, директор ДУ «Національний інститут фтизіатрії і пульмонології ім. Ф. Г. Яновського НАМН України»;

О. А. Журило – д-р мед. наук, професор, керівник лабораторії мікробіології і біохімії туберкульозу ДУ «Національний інститут фтизіатрії і пульмонології ім. Ф. Г. Яновського НАМН України»;

А. І. Барбова – канд. мед. наук, керівник референс-лабораторії з мікробіологічної діагностики туберкульозу НАМН України, старший науковий співробітник лабораторії мікробіології і біохімії туберкульозу ДУ «Національний інститут фтизіатрії і пульмонології ім. Ф. Г. Яновського НАМН України»;

О. В. Чернов – лабораторний спеціаліст проекту USAID “Підтримка зусиль у протидії ТБ в Україні” (PATH);

Н. М. Жеребко – консультант проекту USAID “Підтримка зусиль у протидії ТБ в Україні” (PATH);

М. С. Яременко – молодший науковий співробітник лабораторії мікробіології і біохімії туберкульозу ДУ «Національний інститут фтизіатрії і пульмонології ім. Ф. Г. Яновського НАМН України”.

У навчальному виданні представлені сучасні методики, які використовуються при повногеномному секвенуванні *M. tuberculosis* на платформі Illumina MiSeq. Вони наводяться згідно етапів секвенування в 6 стандартних операційних процедурах (СОПи):

1. Виділення високомолекулярної ДНК мікобактерій за допомогою набору реагентів QIAamp® DNA Mini Kit.

2. Вимірювання концентрації ДНК з використанням спектрофотометра Denovix і флуорометра Quantus. Розведення ДНК до концентрації 0.2 нг/мкл.

3. Приготування бібліотеки ДНК з використанням набору Nextera XT для повногеномного секвенування.

4. Аналіз розміру бібліотек з використанням фрагментного аналізатора «Fragment Analyzer 5200».

5. Запуск секвенування на платформі Illumina MiSeq.

6. Аналіз файлів даних FASTQ за допомогою біоінформатичного інструменту MTBseq для визначення генотипу та виявлення мутацій у генах, асоційованих з резистентністю до протитуберкульозних препаратів при повногеномному секвенуванні.

СОПи створені і використовуються в лабораторії мікробіології і біохімії НІФП НАМНУ.

Для організаторів і фахівців лабораторій закладів протитуберкульозної служби України, студентів медичних закладів вищої освіти, лікарів-фтизіатрів, наукових і педагогічних працівників, які займаються проблемами діагностики і лікування хворих на туберкульоз.

**Рецензенти:**

І. А. Калабуха – д-р мед. наук, професор, заступник директора з наукової та науково-організаційної роботи ДУ «Національний інститут фтизіатрії і пульмонології ім. Ф. Г. Яновського НАМН України»;

Г. Л. Гуменюк – д-р мед. наук, професор кафедри фтизіатрії і пульмонології Національного університету охорони здоров'я України ім. П. Л. Шупика.

Навчальний посібник розроблений за підтримки американського народу через проект Агентства США з міжнародного розвитку (USAID) “Підтримка зусиль у протидії ТБ в Україні”. Проект виконується міжнародною організацією PATH.

Зміст навчального посібника є відповідальністю авторів та необов'язково збігається з точкою зору USAID або уряду США.

	С.
	5
СОП 1	8
1.1	10
1.1.1	10
1.1.2	12
1.1.3	13
1.1.4	14
1.1.5	16
СОП 2	18
2.1	20
2.1.1	20
2.1.2	21
2.1.3	22
2.1.4	23
2.1.5	24
2.1.6	25
СОП 3	27
3.1	29
3.1.1	29
3.1.2	31
3.1.3	32
3.1.4	35
3.1.5	36
3.1.6	36
3.1.7	38
3.1.8	38
СОП 4	40
4.1	42
4.1.1	42
4.1.2	43
4.1.3	44

4.1.4	Підготовка плашки для буферів	44
4.1.5	Підготовка маркера молекулярних мас та зразків	45
4.1.6	Підготовка фрагментного аналізатора до роботи	46
4.1.7	Запуск електрофорезу та облік результатів	47
4.1.8	Обробка експериментальних даних	48
4.1.9	Документація	50
СОП 5	ЗАПУСК СЕКВЕНУВАННЯ НА ПЛАТФОРМІ ILLUMINA MISEQ	53
5.1	Проведення	54
5.1.1	Підготовка обладнання та реагентів	54
5.1.2	Розморожування картриджа з реагентами	56
5.1.3	Створення таблиці зразків на MiSeq	56
5.1.4	Завантаження картриджа в MiSeq	57
5.1.5	Документація	59
СОП 6	АНАЛІЗ ФАЙЛІВ ДАНИХ FASTQ ЗА ДОПОМОГОЮ БІОІНФОРМАТИЧНОГО ІНСТРУМЕНТУ MTBSEQ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ГЕНОТИПУ ТА ВИЯВЛЕННЯ МУТАЦІЙ У ГЕНАХ, АСОЦІЙОВАНИХ З РЕЗИСТЕНТНІСТЮ ДО ПРОТИТУБЕРКУЛЬОЗНИХ ПРЕПАРАТІВ ПРИ ПОВНОГЕНОМНОМУ СЕКВЕНУВАННІ	61
6.1	Алгоритм виконання	63
6.2	Результати аналізу даних	66
6.3	Документація	69
	ЗАКЛЮЧЕННЯ	70

## ПЕРЕДМОВА

На сьогодні туберкульоз (ТБ) залишається однією з найактуальніших проблем сучасної медицини. До основних особливостей захворювання в сучасних умовах необхідно віднести збільшення захворюваності в групах ризику, високу смертність, ко-інфекцію ТБ/ВІЛ-СНІД, а також зміну біологічних особливостей популяції мікобактерій, найважливішою з яких є лікарська стійкість (ЛС) *M. tuberculosis*. Вирішення проблеми ТБ неможливе без своєчасного виявлення хворих, застосування ефективних методів діагностики цього інфекційного захворювання та своєчасне призначення лікування. Частота виявлення *M. tuberculosis* залежить від багатьох чинників. Це передусім методи, які застосовуються для діагностики ТБ, та мають різну результативність, оснащення лабораторій, кваліфікація кадрів, інформативність зразків матеріалу, що доставляються, наявність біологічної безпеки при роботі із зразками, яка запобігає їх контамінації при проведенні досліджень.

Сучасні методи лабораторної діагностики ТБ можна умовно поділити на 2-і великих групи:

– *фенотипічні методи*, які широко використовуються нині в бактеріологічних лабораторіях протитуберкульозних закладів України. Це бактеріоскопія світлова і люмінесцентна, а також культуральний метод діагностики, який дозволяє здійснити виділення збудника, його ідентифікацію, визначити його ЛС;

– *молекулярно-генетичні технології*, які засновані на виявленні ДНК збудника, що дозволяє в подальшому провести його генетичну ідентифікацію та визначити локуси ЛС.

Молекулярно-генетична діагностика вважається найбільш перспективним шляхом до швидкого універсального тестування лікарської чутливості збудника ТБ. У 2021 р. під егідою ВООЗ було опубліковано найповніший каталог генетичних детермінант, асоційованих з ЛС *M. tuberculosis* до всього спектру ПТП на основі результатів фенотипового аналізу та повногеномного секвенування 41 137 ізолятів збудника *M. tuberculosis* з 45 країн, у тому числі 1550 штамів (3,8 %), зібраних лабораторією мікробіології та біохімії НІФП (м. Київ). Використання цього каталогу надає доступ до найбільш повної та стандартизованої генотипової характеристики ЛС *M. tuberculosis*.

Аналізуючи перспективи розвитку лабораторної діагностики ТБ, необхідно відзначити новітні технології секвенування геному *M. tuberculosis*, а саме секвенування нового покоління (Next Generation Sequencing, NGS). Технології NGS здатні в короткий проміжок часу забезпечити прочитання

ділянок бактеріальних геномів різної протяжності, які можуть бути зібрані в більш довгі або навіть цілі геномні послідовності з використанням біоінформатики. Завдяки цьому з одного зразка можна отримати вичерпну інформацію про збудник, що включає видову ідентифікацію, визначення генетичних детермінант, асоційованих з ЛС *M. tuberculosis* до всього спектру ПТП, і визначити молекулярно-епідеміологічні маркери, що встановлюють належність *M. tuberculosis* до світових штамових ліній.

В даний час на ринку представлено безліч платформ для NGS, у тому числі інструменти із середньою та високою пропускну здатністю, наприклад Bio-Rad Laboratories (GnuBio); Illumina (MiSeq, HiSeq та NextSeq); Oxford Nanopore (minION, PromethION, GridION); PacBio (Sequel та RS2); Thermo Fisher (SOLiD, S5, індивідуальний genome machine [PGM], Proton); Qiagen (GeneReader) та Vela Diagnostics NGS platform (Singapore). Перераховані платформи відрізняються один від одного розміром і вартістю одного читання і частотою помилок. Причому розмір читання часто є критичним параметром при роботі з мікобактеріями. Справа в тому, що геном *M. tuberculosis* містить множинні елементи, що повторюються, довжина яких становить від сотень до тисяч пар основ (п.о.). NGS, що забезпечують короткі читання (менше 1000 п.о.), наприклад, виробництва Thermo Fisher, не здатні перекрити ці повтори, що унеможливорює складання повного генома. Однак NGS, здатні робити довгі читання (більше 5000 п.о.), такі як технології Oxford Nanopore, позбавлені такого недоліку. При цьому платформи, що здійснюють короткі читання, ідеальні для таргетного секвенування, що дозволяє детально вивчити послідовність будь-якого з генів, асоційованих з ЛС *M. tuberculosis*. Для визначення точної генетичної основи резистентності до більшості ПТП створено бази даних, такі як TBDreamDB та MUBII-TB-DB, що містять інформацію про мутації, асоційовані з ЛС *M. tuberculosis*. Додатково розроблено програмний інструмент «TB profiler», заснований на інформації про ЛС *M. tuberculosis* до 11 препаратів внаслідок 1325 мутацій, що дозволяє обробити дані секвенування та передбачити ЛС *M. tuberculosis* in silico. Вже існують дослідження з достатньою мірою надійності, що передбачають ЛС за даними повногеномного секвенування культур *M. tuberculosis*.

Існує ряд проблем, з якими може зіткнутися реалізація NGS у клінічних цілях. По-перше, це кількість та якість досліджуваної ДНК: можуть виникнути труднощі при тестуванні олігобацилярних клінічних зразків через недостатню кількість матеріалу для аналізу. Крім того, картина секвенування може бути спотворена внаслідок домішки неспецифічної ДНК мікрофлори. Тому сучасні

пілотні дослідження як джерело ДНК використовують, як правило, чисту культуру збудника.

По-друге, певну проблему для поширення NGS представляє величезний масив даних, отримуваний під час проведення досліджень. Обробка даних передбачає картування (mapping) або складання геному, визначення базового варіанта та порівняльний філогенетичний аналіз. Програмне забезпечення та алгоритми для кожного з цих етапів досить складні та потребують навичок біоінформатики. Частково вирішити цю проблему дозволить платформа Re-Seq, яка була запущена у квітні 2016 р. та дозволяє у вільному доступі будь-яким лабораторіям завантажувати та аналізувати дані NGS. Отже, в даний час підготовка зразків, сама процедура секвенування та обробка отриманих даних є складним процесом, що вимагає участі висококваліфікованого персоналу. Тим не менш, у NGS-технологіях закладено великий потенціал для вдосконалення діагностики ЛС *M. tuberculosis*.

Хоча технології секвенування в даний час недоступні для більшості країн з низьким та середнім рівнем економіки, проте вартість обладнання та реагентів продовжує падати, а технології – удосконалюватися, і в найближчому майбутньому з'являться можливості широко поширити технологію. Крім того, з розвитком нових схем терапії ТБ, у тому числі із застосуванням нових препаратів, паралельно мають розвиватися і діагностичні алгоритми, що дозволяють своєчасно виявляти випадки резистентності під час застосування нових схем. Повногеномне секвенування ідеально підходить для цих завдань.

Слід відзначити, що в лабораторії мікробіології і біохімії НІФП НАМНУ в теперішній час проводиться впровадження методик повногеномного і таргетного секвенування *M. tuberculosis*.

Також треба віднести і до технологій NGS і вже сьогодні впроваджувати їх у діагностичну практику на базі мікробіологічних лабораторій великих фтизіатричних центрів. І тоді в міру розвитку та вдосконалення технології NGS у перспективі набудуть широкого поширення. Швидко, протягом кількох днів, отримання в одному тесті повної інформації про збудник сприятиме вдосконаленню діагностики ТБ і, як наслідок, підвищенню ефективності терапії, а також поглибленню знань про біологічні властивості збудника ТБ, що виведе заходи щодо контролю за ТБ на новий рівень.

# СОП 1 ВИДІЛЕННЯ ВИСОКОМОЛЕКУЛЯРНОЇ ДНК МІКОБАКТЕРІЙ ЗА ДОПОМОГОЮ НАБОРУ РЕАГЕНТІВ QIAAMP® DNA MINI KIT

## Мета

Описати спосіб виділення високомолекулярної ДНК штамів *M. tuberculosis* високої концентрації за допомогою комерційного набору реагентів QIAamp® DNA Mini kit з метою подальшого використання отриманого генетичного матеріалу для проведення секвенування.

## Скорочення та значення

Скорочення	Значення
ДНК	– дезоксирибонуклеїнова кислота,
нг/ng	– нанограм,
мкл/μl	– мікролітр,
об/хв	– обертів за хвилину,
КСБ	– кислотостійкі бактерії,
Мл	– мілілітр,
Мг	– міліграм,
Мм	– міліметр,
мМ	– мілімоль,
G	– сила центрифугування (прискорення),
Об	– оберт,
Хв	– хвилинка,
СОП	– стандартна операційна процедура,
Middlebrook 7H9	– рідке поживне середовище для мікобактерій,
BD BACTEC MGIT 960 Medium	– пробірка з модифікованим бульйоном Міддлбрука 7H9 з індикатором росту мікобактерій,
По	– пари основ,
пМ	– пікомоль.

## Опис

Для успішного проведення процедури секвенування ДНК необхідна їй достатня кількість і хороша якість. У комерційних наборах реагентів QIAamp® DNA Mini kit виділення відбувається за допомогою колонок.



### *Матеріал*

Для виділення ДНК може бути використаний наступний матеріал:

- Культура *M. tuberculosis* з рідкого поживного середовища BD BACTEC MGIT 960 Medium;
- Культура *M. tuberculosis* з щільного поживного середовища Левенштейна-Єнсена.

### *Прилади*

- Термоблок/інкубатор
- Високошвидкісна центрифуга (14000 об/хв, 12–24, 1,5–2,0 мл)
- Вортекс
- ШББ 2 класу біозахисту
- Морозильна камера не вище -20 °С
- Спектрофотометр Denovix
- Флюорометр Quantus
- Набір автоматичних дозаторів: 0,5–10 мкл, 20–200 мкл, 100–1000 мкл
- Холодильна камера
- Магнітна мішалка

### *Реагенти, витратні матеріали*

- Лізоцим
- Дистильована вода
- Пластикові одноразові мікропробірки об'ємом 1,5/2,0 мл
- Пластикові пробірки оптично прозорі вільні від ДНКаз/РНКаз 0,5 мл
- Наконечники одноразові 10 мкл; 100 мкл; 200 мкл; 300 мкл; 1000 мкл
- Респіратор та одноразовий медичний халат
- Одноразові рукавички
- Набір QIAamp® DNA Mini Kit
- 96,0 % Етанол
- 1М Tris-HCl, pH 8.0
- 0,5 М EDTA

- 20,0 % Triton X-100
- РНКаза А (100 мг/мл)
- Скляні пробірки
- Ультрарачиста вода (для молекулярної біології)
- Стерильний фізіологічний розчин

### ***1.1 Проведення***

#### ***Важливо!***

*Усі маніпуляції мають виконуватись у спеціальному захисному одязі та засобах індивідуального захисту. Зміна гумових рукавичок має відбуватися при переході від однієї маніпуляції до іншої або при забрудненні матеріалом!*

Усі процеси центрифугування повинні проводитися при кімнатній температурі (15–25 °С).

Усі зразки перед початком роботи повинні бути доведені до кімнатної температури (15–25 °С).

#### ***1.1.1 Приготування реагентів***

Усі реагенти, що будуть використовуватися для виділення ДНК повинні бути кімнатної температури, якщо інше не передбачено інструкцією використання від виробника реагентів. Зберігання та використання готових реагентів повинно відбуватися згідно інструкцій виробника.

- **Лізуючий буфер з лізоцимом (20,0 мг/мл лізоцим):**
- Приготування 100 мл (20,0 % Triton X-100)

*Тритон X-100 – це дуже в'язка рідина. Точно перенести потрібний об'єм Тритону X-100 важко через його в'язкість, тому готується 20,0 % розчин.*

В скляну ємність достатнього об'єму шпателем перенесіть 21,4 г *Тритон X-100*.

Додайте 80,0 мл ультрарачистої води для молекулярних досліджень та перемішайте на магнітній мішалці поки рідина не стане прозорою.

*Зберігати розчин при +4 °C до 1 року.*

– Приготуйте ТЕ буфер (20,0 mM Tris-HCl, pH 8.0, 2,0 mM EDTA, 1,2 % Triton X-100) наступним чином:

До 2,0 мл 1M Tris-HCl (pH 8.0) додайте 0,4 мл 0,5 M EDTA та 5,0 мл 20,0 % Triton X-100.

Перемішайте та доведіть об'єм до 100 мл ультрачистою водою для молекулярних досліджень.

– Приготуйте стоковий розчин лізоциму (20,0 мг/мл) наступним чином:

a. Зважити 100 мг лізоциму (тримати контейнер з лізоцимом на льоду).

b. Додати 5,0 мл ТЕ буферу, перемішати (аліквотувати в 2,0 мл пробірках по 1,5 мл та зберігати при -20 °C).

***Важливо!***

*Розчин лізоциму зберігати 2–3 тижні при -20 °C, ліофілізований – при +7–8 °C до 1 року.*

– **Буфер AW1:**

Буфер AW1 входить до набору реагентів QIAamp® DNA Mini Kit у вигляді концентрату. Перед першим використанням додайте відповідну кількість етанолу (96–100 %), як зазначено на флаконі. Нанесіть на флакон маркування з датою приготування! Готовий буфер AW1 стабільний протягом 1 року, при зберіганні закритим за кімнатної температури.

– **Буфер AW2:**

Буфер AW2 входить до набору реагентів QIAamp® DNA Mini Kit у вигляді концентрату. Перед першим використанням додайте відповідну кількість етанолу (96–100 %), як зазначено на флаконі. Нанесіть на флакон маркування з датою приготування! Готовий буфер AW2 стабільний протягом 1 року, при зберіганні закритим за кімнатної температури.

– **Протеаза QIAGEN**

Внесіть 1,2 мл розчинника протеази у флакон, що містить ліофілізовану протеазу QIAGEN, як зазначено на етикетці. Нанесіть на флакон дату приготування! Розчинена протеаза QIAGEN стабільна до 1 року при зберіганні при 2–8 °С.

– **Буфер AL**

Перед застосуванням перемішати струшуванням.

Якщо в буфері AL утворився осад, розчиніть його шляхом інкубації при 56 °С.

Буфер зберігається при кімнатній температурі протягом 1 року.

**1.1.2 Підготовка біологічного матеріалу для виділення ДНК**

Культура *M. tuberculosis* з рідкого поживного середовища MGIT.

Культуру *M. tuberculosis*, що виросла на середовищі Middlebrook 7H9, потрібно попередньо оцінити щодо наявності КСБ за допомогою мікроскопії з забарвленням за Цілем-Нільсеном. Оцінити мутність суспензії відповідно до стандарту McFarland за допомогою денситометра. Мутність повинна відповідати стандарту McFarland 1.0 або вище. Перемішати культуру на вортексі, залишити на робочому столі на 3–5 хв для відстоювання. Для дослідження стерильною пастерівською піпеткою з середньої товщі стовпчика суспензії необхідно акуратно перенести 1,0 мл бактеріальної зависі в стерильну термостійку мікропробірку об'ємом 2,0 мл.

Підготовану як описано вище культуру *M. tuberculosis* необхідно інактивувати в термоблоці при температурі +95 °С протягом 30 хв.

Підготовані таким чином пробірки з матеріалом мають бути передані в зону виділення ДНК.

Культура *M. tuberculosis* з щільного поживного середовища Левенштейна-Єнсена.

Культуру *M. tuberculosis*, що виросла на щільному поживному середовищі Левенштейна-Єнсена, потрібно попередньо оцінити щодо наявності КСБ за допомогою мікроскопії з забарвленням за Цілем-Нільсеном.

Для приготування бактеріальної суспензії:

1. Стерильним тампоном/шпателем охайно зняти колонії мікобактерій (кількість еквівалентна 2-м бактеріологічним петлям діаметру 0,5 см). Перенесення шматочків поживного середовища є неприпустимим!

2. Перенести тампон із забраною культурою в стерильну скляну пробірку, що містить 2,0–3,0 мл ультрачистої води, змити культуру *M. tuberculosis* об стінки пробірки та акуратно перемішати.

3. Оцінити мутність суспензії відповідно до стандарту McFarland за допомогою денситометра. Мутність повинна відповідати стандарту McFarland 1.0 або вище.

4. Пробірку з ресуспендованою культурою *M. tuberculosis* залишити на 2–3 хв для осадження великих конгломератів та стерильною пастерівською піпеткою перенести 1,0 мл бактеріальної суспензії в стерильну термостійку мікропробірку об'ємом 2,0 мл.

Підготовану як описано вище культуру *M. tuberculosis* необхідно інактивувати в термоблоці при температурі +95 °С протягом 30 хв.

Підготовані таким чином пробірки з матеріалом мають бути передані в зону виділення ДНК.

### ***1.1.3 Виділення та зберігання геномної ДНК з *M. tuberculosis****

1. Інактивовані культури *M. tuberculosis* центрифугуйте 10 хв при 5000 x g (7500 об/хв). Видаліть надосадову рідину.

2. Осад інактивованої культури ресуспендуйте на вортексі в 180 мкл лізуючого буфера з лізоцимом.

3. Інкубуйте 18 год (протягом ночі) за температури +37 °С.

4. Додайте 20,0 мкл Протеїнази К (з набору), 4,0 мкл РНКازی А (100 мг/мл) і 200 мкл буфера AL. Ретельно перемішайте на вортексі.\*

\* – процедура відрізняється від вказаного в інструкції. Протеїназа К, РНКазі А та AL буфер додаються та інкубуються одночасно.

***Важливо! Не додавайте Протеїназу К безпосередньо до буфера AL.***

5. Інкубуйте за температури +56 °С протягом 30 хв, а потім 15 хв за температури +95 °С.

Тривала інкубація при 95 °С може призвести до деградації ДНК.

6. Осадіть краплі з кришки пробірки шляхом центрифугування при максимальній швидкості центрифуги-вортекса протягом 5 сек.

7. Додайте 200 мкл 96–100 % етанолу до лізованих бактерій. Ретельно перемішайте на вортексі впродовж 15 сек.

8. Осадіть краплі з кришки пробірки шляхом центрифугування при максимальній швидкості центрифуги-вортекса протягом 5 сек.

***Важливо!***

*Зразок, буфер AL і етанол мають бути ретельно перемішані, щоб отримати однорідний розчин. При додаванні етанолу може утворитися білий осад. Необхідно перенести весь осад на спін-колонку QIAamp Mini.*

*Цей осад не заважає процедурі QIAamp або будь-якому подальшому застосуванню.*

*Не використовуйте інші спирти, крім етанолу, оскільки це може призвести до зниження виходу ДНК.*

***1.1.4 Зв'язування геномної ДНК на виділювальній колонці***

1. Перед початком етапу зв'язування ДНК приготуйте буфери для відмивання AW1 і AW2: ретельно перемішайте буфери перед використанням.

2. Приготуйте таку кількість QIAamp Mini спін колонок, що відповідає кількості виділених зразків та промаркуйте їх. Вставте колонки в збиральні пробірки.

3. Перенесіть увесь приготований бактеріальний лізат з осадом включно у кожну колонку.

4. Центрифугуйте колонки на швидкості 6000 x g (8000 об/хв) протягом 1 хв за кімнатної температури. Якщо розчин не повністю пройшов через мембрану, повторіть центрифугування на більшій швидкості щоб весь розчин пройшов.

5. Замініть нижню збиральну пробірку з фільтратом\* на нову.

\* – фільтрат містить буфер AL або буфер AW1, до складу яких входить гуанідину гідрохлорид, і з гіпохлоридом натрію утворюють високореактивні суміші, тому утилізацію таких пробірок доцільно проводити в сухій ємності.

6. Додайте 500 мкл буферу для відмивання AW1 в кожному з колонок.
7. Центрифугуйте колонки на швидкості 6000 x g (8000 об/хв) протягом 1 хв за кімнатної температури.
8. Замініть нижню збиральну пробірку з фільтратом на нову.
9. Додайте 500 мкл буферу для відмивання AW2 в кожному з колонок.
10. Центрифугуйте колонки на максимальній швидкості 13300 об/хв протягом 3 хв за кімнатної температури.
11. Для зменшення вірогідності потрапляння буфера AW2 до елюату, рекомендується замінити нижню збиральну пробірку на нову (не входить в комплект, використайте мікропробірки об'ємом 2,0 мл з відрізними кришками).
12. Центрифугуйте колонки на максимальній швидкості протягом 1 хв за кімнатної температури.
13. Помістіть QIAamp Mini колонку в чисту мікроцентрифужну пробірку об'ємом 1,5 мл (не входить у комплект) і видаліть пробірку для збору з фільтратом. Обережно відкрийте спін-колонку QIAamp Mini і додайте 40,0 мкл буфера AE або дистильованої води (об'єм оптимізовано для збільшення початкової концентрації ДНК).
14. Інкубуйте при кімнатній температурі протягом 1 хв, а потім центрифугуйте при 6000 x g (8000 об/хв) протягом 1 хв.
15. Виділена геномна ДНК міститься в центрифугаті.
16. Виміряйте концентрацію отриманої ДНК, відповідно СОП 2 *“Вимірювання концентрації ДНК з використанням спектрофотометра DeNovix і флуорометра Quantus. Розведення ДНК до концентрації 0.2 нг/мкл” та запишіть результати вимірювань.*

## Зберігання

- Зберігайте виділену ДНК за температури не вище -20 °С до 3–4 місяців

### 1.1.5 Документація

Інформацію про проведену процедуру оцінки концентрації та якості отриманої ДНК внести в формуляр 1 “Реєстрація вимірювання концентрації і якості ДНК” (Додаток 1), а також в формуляр 2 “Реєстрація зразків, узятих для дослідження методом секвенування” (Додаток 2).

Супутні документи:

- Suggested citation. Guidance for the surveillance of drug resistance in tuberculosis, sixth edition. Geneva: World Health Organization; 2020. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

- QIAamp DNA Mini Blood Mini Handbook. Fifth Edition May 2016. [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

Список змін

Версія	Зміни	Набула чинності
01	Нова	

Лист реєстрації ознайомлення

Підписуючи цю сторінку, персонал і керівництво лабораторії підтверджують, що вони прочитали стандартну операційну процедуру і зобов’язуються виконувати описану процедуру належним чином.

№	ПІБ	Посада	Дата	Підпис
1				

Додаток 1

Формуляр 1 Реєстрація вимірювання концентрації і якості ДНК

№ зразка	Концентрація ДНК Denovix	A260/A280	260/230	Концентрація ДНК Quantus (після екстракції)	Концентрація ДНК Quantus (готові бібліотеки)	Середня довжина фрагментів п.о.	Концентрація в нМ
1							



## Формуляр 2 Реєстрація зразків, узятих для дослідження методом секвенування

Код пацієнта	1	2	3	4
Дата відбору зразка				
Місце зберігання зразка				
Дата посіву/інокуляції на живильне середовище Левенштейна-Єнсена				
Тип живильного середовища				
Дата виділення ДНК				
Метод виділення ДНК				
Спеціаліст, що виділив ДНК (ПІБ)				
Концентрація ДНК, нг/мкл (Quantus)				
Концентрація ДНК, нг/мкл (Denovix)				
Коефіцієнт 260/280				
Коефіцієнт 260/230				
Дата приготування NGS бібліотеки				
Метод приготування NGS бібліотеки				
Серійний номер набору для приготування бібліотек				
Спеціаліст, що приготував NGS бібліотеку				
Концентрація бібліотеки, нг/мкл (Quantus)				
Файл профілю (FA) бібліотеки (назва)				
Індекси i5/i7				
Місце зберігання файлу профілю (FA)				
Середній розмір бібліотеки, п.о.				
Завантажувальна концентрація, пМ				
Дата секвенування				
Тип секвенування (наприклад 2x151)				
Серійний номер проточної комірки				
Серійний номер картриджа				
Показник якості, Q30				
Кількість зчитування, млн				
Назва файлу FASTQ				
Місце зберігання файлу FASTQ				
Дата аналізу				
Спеціаліст, що виконав аналіз				
Назва програм(и) для аналізу				
Генотип				
АБ резистентність				
АБ чутливість				

## СОП 2 ВИМІРЮВАННЯ КОНЦЕНТРАЦІЇ ДНК ЗА ДОПОМОГОЮ СПЕКТРОФОТОМЕТРА DENOVIX ТА ФЛУОРОМЕТРА QUANTUS. РОЗВЕДЕННЯ ДНК ДО КОНЦЕНТРАЦІЇ 0,2 НГ/МЛ

### Мета

Описати процедури вимірювання концентрації і визначення якості виділеної ДНК, а також приготування розведень виділеної ДНК до необхідних концентрацій для використання в дослідженні методом секвенування.

### Скорочення та значення

Скорочення	Значення
ДНК	– дезоксирибонуклеїнова кислота,
Нг	– нанограм,
Нм	– нанометри,
Мкл	– мікролітр,
мМ	– мілімоль,
Мл	– мілілітр,
TRIS	– трис(гідроксиметил)амінометан,
HCl	– соляна кислота,
pH	– рН,
TE-Буфер	– буфер, що містить ТРИС (трис (гідроксиметил) амінометан) та ЕДТА (етилендіамінтетраоцтову кислоту).

### Опис

Зазвичай при використанні будь якого методу виділення в розчин ДНК потрапляють домішки РНК, білків та інших органічних сполук. Для успішного проведення секвенування необхідна достатня кількість і хороша якість ДНК. Поглинання УФ-випромінювання – це поширений метод, що використовується для оцінки чистоти зразка ДНК.

Після завершення процедури виділення ДНК з культури необхідно визначити концентрацію речовини в розчині. Для цього використовують спектрофотометр Denovix.

Вихід ДНК визначають за концентрацією ДНК в елюаті, виміряною за поглинанням УФ хвиль при 260 нм. Коефіцієнт співвідношення поглинання при

260 нм до поглинання при 280 нм вказує на чистоту зразка. Чиста ДНК має коефіцієнт співвідношення  $A_{260}/A_{280}$  1,7–1,9.

Вторинним показником чистоти зразка є коефіцієнт співвідношення поглинання при 260 нм до поглинання при 230 нм. Цільове значення коефіцієнта  $260/230$  становить 2,0–2,2. Значення поза цим діапазоном вказують на наявність контамінантів.

При перевищенні максимального значення коефіцієнту співвідношення  $A_{260}/A_{280}$  зразок потрібно розвести і повторно провести вимірювання концентрації. Для розведення зразків і калібрування спектрофотометра використовуйте буфер для елюювання або воду. Зареєструйте коефіцієнт співвідношення поглинання  $A_{260}/A_{280}$  у журналі.

Для кількісного вимірювання ДНК в розчині використовують флуорометр Quantus та набір для флуориметрії QuantiFluor® ONE dsDNA System. Система QuantiFluor® ONE dsDNA System містить флуоресцентний ДНК-зв'язуючий барвник, який дозволяє проводити чутливий кількісний аналіз невеликих кількостей дволанцюгової ДНК в очищеному зразку. Аналіз високоселективний щодо дволанцюгової ДНК у порівнянні з іншими нуклеїновими кислотами і є лінійним в діапазоні 0,2–400 нг внесеної дволанцюгової ДНК (0,2–400 нг/мкл з 1,0 мкл вихідного зразка).

### **Матеріал**

ДНК, виділена з культури, відповідно до СОП 1 “Виділення високомолекулярної ДНК мікобактерій за допомогою набору реагентів QIAamp® DNA mini kit”.

#### *Прилади*

- Спектрофотометр Denovix
- Флуорометр Quantus
- Мікроцентрифуга
- Центрифуга-вортекс
- Набір дозаторів автоматичних зі змінними об'ємами 0,5–10 мкл; 10–200 мкл; 100–1000 мкл

### *Реагенти, витратні матеріали*

- QuantiFluor® ONE dsDNA Assay Kit (500) (Promega)
- 5,0 mM Tris/HCL-буфер, pH 8.5
- Деіонізована вода
- Оптично прозорі мікропробірки об'ємом 0,5 мл
- Наконечники одноразові з аерозольним фільтром для дозаторів на 10 мкл; 200 мкл; 1000 мкл

## **2.1 Проведення**

### ***Важливо!***

*Усі маніпуляції мають виконуватись у спеціальному захисному одязі та засобах індивідуального захисту. Зміна гумових рукавичок має відбуватися при переході від однієї маніпуляції до іншої або при забрудненні матеріалом!*

Одразу після виділення ДНК проведіть оцінку отриманого матеріалу за допомогою спектрофотометра Denovix. Зразки, що пройшли оцінку якості на ньому і відповідають критеріям прийнятності, підлягають наступній кількісній оцінці на флуорометрі Quantus.

Зареєструйте зразки в Формуляр 2 Реєстрації зразків, узятих для дослідження методом секвенування (додаток 2).

Перемішайте кожен зразок на вортексі протягом 2–5 сек.

Осадіть краплі розчину ДНК в пробірці, які можливо утворилися при вортексуванні, за допомогою центрифуги-вортекса 2–3 сек на максимальній швидкості.

### **2.1.1 Вимірювання концентрації ДНК і визначення якості матеріалу з використанням спектрофотометра Denovix**

- Увімкніть прилад, дочекайтесь завершення завантаження програмного забезпечення та самоперевірки приладу.

– Протріть сухою безворсовою серветкою лунку для зразка і місце на кришці обладнання, що закриває лунку.

– На головному екрані виберіть програму “dsDNA” для вимірювань виділеної ДНК зразків.

– Коли програма відкриється, відкалібруйте спектрофотометр з негативним контролем “Blank”. Для цього нанесіть 1,0 мкл буфера/води на лунку фотометра (наносите ту рідину, в якій розводились зразки після виділення); закрийте кришку фотометра; натисніть кнопку “Blank”, дочекайтесь показників на моніторі. Показання записуються приладом автоматично; протріть сухою серветкою лунку для зразка і місце на кришці обладнання, що закриває лунку.

– Візьміть 1,0 мкл зразка, обережно нанесіть в лунку фотометра, уникаючи утворення бульбашок; закрийте кришку фотометра; запишіть назву зразка у відповідному полі програми; натисніть кнопку “Measure button”, дочекайтесь показників на моніторі; внесіть концентрацію в формуляр; протріть сухою серветкою лунку і кришку.

– Повторюйте цей крок для кожного зразка.

– Дані вимірювань кожного зразка зберігаються автоматично. Можливе перенесення, при необхідності, даних на комп’ютер за допомогою цифрового носія, наприклад флешки.

– Зареєструйте значення в формулярах 1 і 2 (додаток 1 і 2).

Для подальшого дослідження можуть бути використані проби з концентрацією ДНК не менше 10,0 нг/мкл.

## **2.1.2 Вимірювання концентрації ДНК з використанням флуорометра Quantus**

***Важливо!***

*Ретельно контролюйте точність перенесення необхідного об’єму рідини!*

### 2.1.3 Калібрування флуорометра Quantus

Кількісне визначення невідомих зразків вимагає порівняння зі стандартом dsDNA. Приготуйте стандарт, використовуючи ДНК лямбда QuantiFluor® ONE, яка входить до набору dsDNA QuantiFluor® ONE і може використовуватися у якості стандарту ДНК.

1. Перед використанням нагрійте всі компоненти аналізу до кімнатної температури.

2. Приготуйте чистий зразок (**Blank**): додайте 200 мкл QuantiFluor® ONE dsDNA Dye в порожню пробірку для ПЛР об'ємом 0,5 мл. Це буде Blank зразок. Захищайте пробірку від світла.

3. Приготуйте стандартний зразок 400 нг (**Standard**): додайте 1,0 мкл наданого стандарту ДНК QuantiFluor® ONE Lambda (400 мкг/мл) до 200 мкл барвника QuantiFluor® ONE dsDNA Dye в порожню пробірку для ПЛР об'ємом 0,5 мл. Це буде Standard зразок. Перемішайте шляхом піпетування і захищайте пробірку від світла.

4. Інкубуйте підготовлені пробірки протягом 5 хв при кімнатній температурі у захищеному від світла місці.

5. Виміряйте флуоресценцію у підготовлених пробірках Blank та Standard на флуорометрі Quantus™.

- Увімкніть прилад
- Виберіть функцію “ONE DNA”, потім виберіть функцію “Calibrate”
- Виберіть вкладку “Blank”
- Відкрийте кришку флуорометра, вставте пробірку “Blank” і натисніть кнопку “Read Blank”
- Відкрийте кришку флуорометра, видаліть пробірку “Blank” і вставте пробірку “Standard”, натисніть кнопку “Read Standard”
- після завершення вимірювання натисніть кнопку “Save”.

***Важливо!***

*Якщо флуорометр Quantus™ був відкалібрований раніше, вам не потрібно калібрувати його знову.*

## 2.1.4 Вимірювання концентрації ДНК у досліджуваних зразках

1. Приготуйте досліджуваний зразок: додайте 2,0 мкл досліджуваних зразків до 200 мкл QuantiFluor® ONE dsDNA Dye, що внесений в пробірки для ПЛР об'ємом 0,5 мл. Ретельно перемішайте піпетуванням. Захищайте пробірку від світла.

### **Важливо!**

*Для ретельного перемішування вмісту пробірки піпетуванням, встановіть дозатор на 180 мкл і тричі повністю перемішайте вміст пробірки. Слідкуйте за тим, щоб під час змішування не утворилися бульбашки повітря, оскільки вони негативно вплинуть на значення флуоресценції.*

2. Інкубуйте підготовлені пробірки протягом 5 хв при кімнатній температурі у захищеному від світла місці.

3. Увімкніть прилад. Виберіть протокол ONE DNA на флуорометрі Quantus™.

4. Введіть об'єм\* досліджуваної проби та потрібні одиниці концентрації. Щоб ввести об'єм зразка, натисніть кнопки вгору або вниз та оберіть потрібну кількість мкл (1–10, 15, 20, 25, 50, 100, 150 або 200). Щоб вибрати одиниці концентрації, які використовуються для відображення даних, натисніть кнопку вгору або вниз. Оберіть нг/мкл. Коли потрібні одиниці вимірювання будуть обрані, натисніть “Enter”.

### **Важливо!**

*\*Цей об'єм є кількістю зразка, що додається для кількісного визначення. Наприклад, якщо 2,0 мкл зразка було змішано з 200 мкл барвника QuantiFluor® ONE dsDNA Dye, то обсяг, введений на цьому екрані, має становити 2,0 мкл.*

5. Виміряйте флуоресценцію досліджуваного зразка:

– Відкрийте кришку флуорометра, вставте пробірку і натисніть кнопку “Read”.

– Відкрийте кришку флуорометра, видаліть зчитану пробірку і вставте наступну, виберіть кнопку “Read” і так далі провести вимірювання кількості ДНК в усіх зразках.

– після завершення вимірювання в кожній пробірці натисніть кнопку “Save”.

– Відображене на екрані приладу число є концентрацією вихідного зразка.

6. Внесіть дані вимірювання у формуляри 1 і 2 (додаток 1 і 2).

***Важливо!***

*Якщо визначили зразки, які мають більшу концентрацію, ніж стандарт, розбавте зразок і переміряйте, щоб переконатися, що він знаходиться в межах лінійного діапазону стандарту.*

### 2.1.5 Розведення ДНК до концентрації 0.2 нг/мкл

Загальна формула розведення<sup>1</sup>:

$$\frac{x \cdot y}{200 \text{ мкл}} = 0.2 \text{ нг/мкл}$$

де

X – концентрація ДНК, нг/мкл,  
Y – необхідний об’єм, мкл,  
200 мкл – загальний об’єм зразка,  
0.2 нг/мкл – кінцева концентрація.

Таким чином, необхідний об’єм, в залежності від концентрації виділеної ДНК, розраховують за формулою

$$y = \frac{0.2 \cdot 200}{x},$$

Необхідну кількість буфера/води розраховуємо за формулою

$$200 - y = V, \text{ буфера}$$

<sup>1</sup> Під час приготування розведень відповідно до формули кінцевий результат може суттєво відрізнятися від теоретичного через нерівномірну розчинність ДНК. Використовуйте метод послідовних десятикратних розведень, щоб досягти потрібної концентрації.

– Замість розрахунків можна використовувати серію 10-кратних розведень. Наприклад: кожна пробірка буде 10-кратним розведенням наступної. Перша пробірка буде розведена 1:10, друга 1:100, третя 1:1000 і т.д. Заздалегідь



визначте кількість розведень, які потрібно зробити в залежності від кінцевого значення.

– Відповідно до розрахованих значень приготуйте необхідні розведення ДНК в буфері/воді, який був використаний для виділення.

Приготовані розведення ДНК можна заморозити і зберігати за температури не вище  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

*Зберігання зразків для додаткового аналізу*

Зразки зберігати за температури  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  до 3–4 місяців.

### 2.1.6 Документація

Значення проведених вимірювань вносяться в формуляри 1 та 2 (додаток 1 і 2).

Супутні документи

Інструкції від виробника:

- Набір для флуометрії QuantiFluor<sup>®</sup> ONE dsDNA System
- Quantus<sup>™</sup> Fluorometer Operating Manual
- DS-11 Spectrophotometr User Guid

Лист реєстрації змін

№	№ розділу, пункту стандарту, в який внесено зміну	Дата внесення зміни	ПІБ співробітника, який проводив перегляд
1			

Лист реєстрації ознайомлення

Підписуючи цю сторінку, персонал і керівництво лабораторії підтверджують, що вони прочитали стандартну операційну процедуру “Вимірювання концентрації ДНК за допомогою спектрофотометра *DeNovix* і флуорометра *Quantus*. Розведення ДНК до концентрації  $0.2\text{ нг/мкл}$ ” і зобов’язуються виконувати описану процедуру належним чином.

№	ПІБ	Посада	Дата	Підпис
1				

## Формуляр 1 Реєстрація вимірювання концентрації і якості ДНК

№ зразка	Концентрація ДНК Denovix	A260/A280	260/230	Концентрація ДНК Quantus (після екстракції)	Концентрація ДНК Quantus (готові бібліотеки)	Середня довжина фрагментів п.о.	Концентрація в нМ
1							

## Формуляр 2 Реєстрація зразків, узятих для дослідження методом секвенування

Код пацієнта	1	2	3	4
Дата відбору зразка				
Місце зберігання зразка				
Дата посіву/інокуляції на живильне середовище				
Тип живильного середовища				
Дата виділення ДНК				
Метод виділення ДНК				
Спеціаліст, що виділив ДНК (ПІБ)				
Концентрація ДНК, нг/мкл (Quantus)				
Концентрація ДНК, нг/мкл (Denovix)				
Коефіцієнт 260/280				
Коефіцієнт 260/230				
Дата приготування NGS бібліотеки				
Метод приготування NGS бібліотеки				
Серійний номер набору для приготування бібліотек				
Спеціаліст, що приготував NGS бібліотеку				
Концентрація бібліотеки, нг/мкл (Quantus)				
Файл профілю (FA) бібліотеки (назва)				
Індекси i5/i7				
Місце зберігання файлу профілю (FA)				
Середній розмір бібліотеки, п.о.				
Завантажувальна концентрація, пМ				
Дата секвенування				
Тип секвенування (наприклад 2x151)				
Серійний номер проточної комірки				
Серійний номер картриджа				
Показник якості, Q30				
Кількість зчитування, млн				
Назва файлу FASTQ				
Місце зберігання файлу FASTQ				
Дата аналізу				
Спеціаліст, що виконав аналіз				
Назва програм(и) для аналізу				
Генотип				
АБ резистентність				
АБ чутливість				

# СОП 3 ПРИГОТУВАННЯ БІБЛІОТЕКИ ДНК З ВИКОРИСТАННЯМ НАБОРУ NEXTERA XT ДЛЯ ПОВНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНУВАННЯ

## Мета

Описати процедуру підготовки бібліотеки зразків ДНК за допомогою набору Nextera XT DNA Library Prep Kit для подальшої процедури повногеномного секвенування.

## Скорочення та значення

Скорочення	Значення
TD	– буфер для тагментації ДНК (Tagment DNA Buffer),
ATM	– суміш ампліконів для тагментації (Amplicon Tagment Mix),
NT	– нейтралізуючий тагментацію буфер (Neutralize Tagment Buffer),
NPM	– суміш для ПЛР (Nextera PCR Master Mix),
RSB	– буфер для змішування,
ДНК	– дезоксирибонуклеїнова кислота,
РНК	– рибонуклеїнова кислота,
Нг	– нанограм,
Мкл	– мікролітр,
ПЛР	– полімеразна ланцюгова реакція,
мМ	– мілімоль,
NE-буфер	– нейтралізуючий буфер,
HCl	– соляна кислота,
Об/хв	– обертів на хвилину,
Сек	– секунд,
пМ	– пікомоль

## Опис

Протокол підготовки бібліотек Nextera XT DNA Library Prep

- Використовує тагментацію, як ферментативну реакцію, для фрагментації ДНК та додавання послідовностей адаптерів лише за 5 хв;
- Передбачає використання реактивів майстер-міксу, що дозволяє скоротити кількість контейнерів для реактивів, дозування, а також час

проведення аналізу;

- Потребує лише 1,0 нг вхідної ДНК;
- Підтримує роботу з геномами менше 5 Мб.

Основні етапи підготовки бібліотеки зразків виділеної ДНК:

- Тагментація з використанням ферменту транспозази із включенням адаптерів;
- Індекс-ПЛР – мічення зразків;
- Очищення проби від домішок, які можуть пригнічувати процедуру секвенування;
- Контроль якості підготовленої бібліотеки та вимірювання її кількості.

#### *Матеріал*

ДНК в концентрації 0,2 нг/мкл, 5,0 мкл

#### *Прилади*

- Термоциклер
- Вортекс
- Вортекс-шейкер для плашок
- Мікроцентрифуга
- Магнітний штатив DynaMag™-PCR Magnet
- Набір автоматичних дозаторів 8-канальні: 0,5–10 мкл, 20–200 мкл та 1-канальні: 0,5–10 мкл, 20–200 мкл, 100–1000 мкл

- Штативи для роботи з пробірками в холодних умовах (Cool Rack);

#### *Реагенти, витратні матеріали*

- Nextera XT DNA Sample Preparation Kit (96 зразків)
- Nextera XT Index Kit v2 Set A (96 індексів, 192 зразка)
- 10,0 mM TRIS/HCl, pH 7.8
- Набір реагентів PhiX v3 для аналізу якості секвенування MiSeq FC-110-3001)
- Етиловий спирт 96–100 % для молекулярних досліджень

- ПЛР-плашки 96 лункові/8-лункові ПЛР стрип-пробірки
- Кришки для ПЛР стрип-пробірок
- Клейка плівка Microseal B
- Пробірки типу “Еппендорф” об’ємом 1,5 мл, вільні від РНКаз і ДНКаз (з кришкою, що закривається, не обов’язково загвинчується)
- Наконечники для автоматичних дозаторів 10 мкл, 100 мкл, 200 мкл, 300 мкл, 1000 мкл
- Магнітні кульки Agencourt AMPure XP (мікроносії AMPure XP)
- Ультрарачиста вода (для молекулярної біології)
- 1 М NaOH

### **3.1 Проведення**

#### **3.1.1 Тагментація**

З метою тагментації використовується фермент транспозома Nextera для геномної ДНК. Цей етап являє собою процес фрагментації та мічення ДНК за допомогою адаптерних послідовностей – індексів. Порядок виконання цього процесу наступний:

а) Включити попередньо термоциклер з необхідною програмою для нагрівання. Встановити програму “TAGMENTATION”

Програма тагментації:

– Оберіть варіант попереднього нагрівання кришки та встановіть значення 100 °С;

– Встановіть об’єм реакції 50,0 мкл;

– Встановіть режим 55 °С протягом 5 хв;

– Зберігати при температурі 10 °С.

б) Дістати з холодильника реагенти і покласти в бокс з льодом усі компоненти, необхідні для тагментації – TD, ATM (-20 °С), NT (+4 °С) та NPM (-20 °С);

с) Індокси розморозити до кімнатної температури. Осадити краплі з кришок пробірок на максимальній швидкості вортекса;

- d) Розвести ДНК до концентрації 0.2 нг/мкл відповідно до СОП 2. Якщо вона розведена і зберігалася при температурі -20 °С, розморозьте її за кімнатної температури;
- e) Промаркувати нові стрип-пробірки для ПЛР від 1 до 8 (або 96-лункову ПЛР-плашку);
- f) Після відтаювання реагентів (TD, АТМ, NPM, NT) обережно перемішайте їх 3–5 разів шляхом вортексування, крім АТМ, осадіть краплі і тримайте охолодженими на льоду;
- g) Внесіть до підготовлених стрипованих ПЛР пробірок по 10,0 мкл TD Buffer для кожного зразка;
- h) Додайте 5,0 мкл ДНК, розведеної до 0,2 нг/мкл, попередньо перемішавши її піпетуванням;
- i) Додайте 5,0 мкл АТМ-Buffer і перемішайте піпетуванням (20 разів);
- j) Накрийте плашку спеціальною клейкою плівкою для 96 лункових плашок або, якщо використовуєте стриповані ПЛР пробірки, можна закрити спеціальними кришками для цих пробірок;
- k) Перемішайте 10 сек на шейкері та центрифугуйте плашку 5 сек при 1000 об/хв; або 8-гніздові стрип-пробірки 5 сек на максимальних обертах вортекс-центрифуги;
- l) Встановіть ПЛР плашку/стриповані пробірки зі зразками у попередньо нагрітий до 55 °С термоциклер;
- m) Запустіть програму “TAGMENTATION”;
- n) Перемішайте індекси (вклавши в пробірки типу “Еппендорф”), на максимальних обертах вортекс-центрифуги;
- o) Після завершення програми тагментації необхідно відразу ж зняти плашку з термоциклера та *негайно* перейти до наступного кроку, оскільки транспозома все ще активна.
- Зніміть кришку (клейку плівку) із пробірок;
  - Внесіть по 5,0 мкл NT, швидко перемішайте піпетуванням;

- Центрифугуйте плашку 5 сек при 1000 об/хв; або 8-гніздові стрип-пробірки 5 сек на максимальних обертах вортекс-центрифуги;
- Інкубуйте при кімнатній температурі 5 хв.
- р) Перейдіть до Індекс-ПЛР. Переривати процедуру на цьому етапі не можна!

### 3.1.2 Індекс-ПЛР

Змініть програму термоциклера на “Nextera XT PCR” для індекс-ПЛР і перевірте усі її кроки:

- Попереднє нагрівання кришки 100 °С
- Об’єм реакції 50,0 мкл

Програма ампліфікації:

Температура	Час	Кількість повторів (циклів)
72 °С	3 хв	
95 °С	30 сек	
95 °С	10 сек	12 циклів
55 °С	30 сек	
72 °С	30 сек	
72 °С	5 хв	
10 °С охолодження		

#### **Важливо !**

*Комбінація індексів для кожного зразка однієї партії має бути унікальною, а також усі індекси з одного набору повинні використовуватися рівномірно, щоб до закінчення набору не залишилися однакові індекси і не було нераціонального використання набору. Необхідну комбінацію індексів можна роздрукувати з бази індексів після додавання ID зразків (Illumina Experiment Manager/Sample selection).*

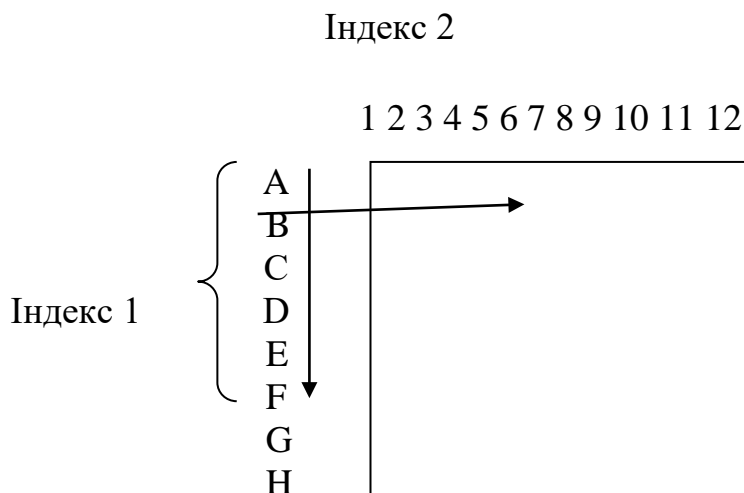
- До тагментованої ДНК додайте по 5,0 мкл індексів 1 (S5xx, з білою кришкою);
- Додайте до тагментованої ДНК 5,0 мкл індексів 2 (N7xx, з помаранчевою кришкою);

- Внесіть 15,0 мкл NPM до тагментованої ДНК;

**Важливо !**

*Під час відкривання кришок індексів ні в якому разі не торкатися внутрішньої сторони кришки. Якщо торкнулися внутрішньої сторони кришки, необхідно замінити її на нову кришку і поміняти рукавички.*

При додаванні індексів зручно використовувати багатоканальні піпетки.



- Закрийте ПЛР-пробірки/плашку кришкою/гумовим матом;
- Перемішайте на вортексі 2–3 сек та осадіть краплі шляхом центрифугування 5 сек;

- Встановіть пробірки/плашку у заздалегідь нагрітий термоциклер;
- Запустіть програму *індекс-ПЛР* - “*INDEX PCR NEXTERA*”.

Всього процес триває приблизно 35 хв. Можливо залишити ПЛР на ніч, неочищена бібліотека може зберігатись при температурі 4 °С до двох днів.

### 3.1.3 Очищення бібліотек

- Попередньо залиште магнітні кульки за кімнатної температури на 20–30 хв;
- Візьміть із термоциклера плашку зі зразками та центрифугуйте 5 сек при 1000 об/хв; або 8-гніздові стрип-пробірки 5 сек на максимальних обертах вортекс-центрифуги;



– Перемішайте на вортексі магнітні кульки, доки розчин не стане однорідним;

– Додайте 30,0 мкл магнітних кульок до зразка. Піпетуйте дуже ретельно і обережно, уникаючи утворення бульбашок, які можуть заважати процесу намагнічування. Для цього необхідно обережно набрати рідину з дна пробірки та обережно по стінці випускати на верхньому рівні рідини. Повторювати цю процедуру до 15–20 разів, поки рідина в пробірці не стане однорідною (Доведіть об'єм дозатора до більше ~60,0 мкл і піпетуйте). Повторіть цей крок для кожного зразка;

– Інкубуйте зразки 5 хв за кімнатної температури;

– Під час інкубування зразків приготуйте 80,0 % етанол – 400 мкл на зразок:

На 1 зразок: до 340 мкл 96,0 % етанолу додайте 68,0 мкл ультрачистої води.

На 8 зразків: до 4,0 мл 96,0 % етанолу додайте 1,0 мл ультрачистої води.

– Вставте пробірки у магнітний штатив;

– Зачекати протягом 1–2 хв, доки всі кульки не пристануть до стінки пробірки/лунки з боку магніту і рідина не стане повністю прозорою;

– Візьміть автоматичний дозатор на 200 мкл з встановленим об'ємом 200 мкл, і, не виймаючи плашку з магнітного штатива, дуже обережно опустіть наконечник на дно пробірки, не торкаючись магнітних кульок, зберіть рідину. Обов'язково перевірити супернатант у наконечнику, щоб у ньому не було магнітних кульок. Видалити супернатант разом із наконечником. Якщо були захоплені кульки, знову злити супернатант у пробірку, трохи почекати, поки магнітні кульки знову не прилипнуть на стороні магніту і знову зібрати рідину і викинути разом з наконечником;

Не дістаючи пробірки з магнітного штативу!

Перше промивання:

– Внесіть 200 мкл 80,0 % етилового спирту по протилежній стінці від магнітних кульок у кожен пробірку, намагаючись не змити магнітні кульки;

- Інкубуйте протягом 30 сек;
- Обережно, не захоплюючи магнітних кульок, автоматичною піпеткою видаліть супернатант;

Друге промивання:

- Внесіть 200 мкл 80,0 % етилового спирту по протилежній стінці від магнітних кульок у кожную пробірку, намагаючись не змити магнітні кульки;
- Інкубуйте протягом 30 сек;
- Обережно, не захоплюючи магнітних кульок, автоматичним дозатором видаліть супернатант;
- Додатково дуже обережно, використовуючи дозатор на 200 мкл і відповідний наконечник видаліть рідину, що залишилася. По можливості видалити всю рідину;
- Залиште пробірки при кімнатній температурі, не виймаючи з магнітного штатива, на кілька хвилин, щоб дати висохнути магнітним кулькам. Важливо не пересушити кульки (!), оскільки ДНК гірше виходитиме в буфер. Зазвичай достатньо 2–8 хв;
- Дістати дуже обережно пробірки з магнітного штатива, щоб кульки не розпорошилися по стінках пробірок;
- Ресуспендуйте магнітні кульки в 52,5 мкл RSB-буфері;
- Перемішайте піпетуванням 15–20 разів, захоплюючи кульки на стінках пробірок до повної гомогенізації розчину;
- Інкубуйте протягом 2 хв при кімнатній температурі;
- Встановіть пробірки у магнітний штатив;
- Зачекайте 2 хв, поки кульки пристануть до стінки з боку магніту і розчин не стане повністю прозорим (Після додавання RSB-буфера ДНК вже від'єдналася від магнітних кульок);
- Перенесіть 50,0 мкл супернатанту без магнітних кульок в пробірки типу Еппендорф, вільні від ДНКаз та РНКаз. Під час перенесення супернатанту в пробірку не допускається захоплення магнітних кульок, оскільки вони

можуть забити капіляри фрагментного аналізатора, а також можуть заважати на етапі секвенування);

– Виміряйте отриману не розведену ДНК за допомогою Quantus (очікувана концентрація повинна становити від 2,0 нг/мкл). Внесіть отримані дані у Формуляри.

– Проаналізуйте нерозведену бібліотеку за допомогою фрагментного аналізатора “Fragment Analyzer 5200” відповідно до СОП4.

### 3.1.4 Розведення бібліотек та денатурація

Для денатурації бібліотек та створення кластерів завжди готуйте свіжий розчин NaOH. Цей крок є важливим для процесу денатурації!

Приготування 0,2 М розчину NaOH:

– Перенесіть 800 мкл води для молекулярних досліджень в пробірку об’ємом 1,5 мл;

– Додайте 200 мкл 1 М NaOH (сток);

– Обережно перемішайте розчин шляхом перевертання пробірки декілька разів.

Для розведення бібліотек використовують мікроцентрифужні пробірки об’ємом 1,5 мл. Отриману бібліотеку розводимо до концентрації 4 нМ, використовуючи буфер RSB.

Перерахуйте концентрацію зразків із нг/мкл в нМ/мкл. Для перерахунку використовуйте наступну формулу:

$$\frac{C(\text{нг}) \cdot 3 \cdot 500}{L} = K \text{ нМ/мкл, де}$$

C(нг) – концентрація в нг/мкл

L – довжина фрагментів, п.о.

K – концентрація в нМ/мкл

- Перемішайте отримані бібліотеки на вортексі 2–3 сек та осадіть краплі впродовж 5 сек на максимальних обертах;
- Для розрахунку необхідного об'єму отриманої бібліотеки для розведення до кінцевої концентрації 4,0 нМ/мкл використовуємо формулу:

$$y=(4*10)/x, \text{ де}$$

X	– концентрація ДНК у бібліотеці, нМ/мкл
Y	– необхідний об'єм, мкл
10,0 мкл	– загальний об'єм зразка
4,0 нМ/мкл	кінцева концентрація

- Необхідний об'єм RSB буфера (V(RSB)) розраховуємо за формулою:

$$V(RSB)=10 - y$$

- Підготуйте необхідну кількість пробірок об'ємом 1,5 мл, промаркуйте їх. Приготуйте розведення бібліотек за отриманими розрахунками.

*Для бібліотек із концентрацією, що дорівнює або є меншою ніж 4 нМ/мкл, використовуйте 10,0 мкл нерозведеної бібліотеки.*

### **3.1.5 Об'єднання зразків в загальний пул для проведення секвенування**

- Візьміть мікроцентрифужну пробірку об'ємом 1,5 мл, підпишіть «Пул»;
- Перенесіть по 10,0 мкл кожної бібліотеки (концентрацією 4,0 нМ/мкл) та об'єднайте їх у підготовленій пробірці.

#### ***Важливо!***

*Якщо ви не плануєте негайно переходити до наступного етапу, бібліотеки можна зберігати при -20 °С до одного тижня. Після відтаювання бібліотеки підлягають гомогенізації та кількісному аналізу.*

*Усі наступні етапи денатурування та розведення необхідно робити безпосередньо в день проведення секвенування!*

*Отримані продукти цих процесів не підлягають зберіганню, оскільки створення кластерів буде погіршуватись (зменшуватись)!*

### **3.1.6 Денатурування та розведення PhiX контролю до 12,0 пМ**

Універсальний PhiX Control – це надійна готова до використання бібліотека, яка слугує контролем для циклів секвенування Illumina. Вона отримана з невеликого, добре охарактеризованого геному PhiX. Бібліотека PhiX забезпечує контроль якості для генерації кластерів, секвенування та вирівнювання, а також контроль калібрування для генерації матриці перехресних перешкод та попереднього фазування.

***Важливо!***

*Пробірку з PhiX контролем постійно, під час проведення тестування тримати в холодному штативі!*

– Розведіть PhiX контроль до концентрації 4,0 нМ/мкл розчину в 1,5 мл пробірці: до 3,0 мкл в буфера RBS додайте 2,0 мкл 10 нМ PhiX контролю.

– Денатуруйте PhiX контроль: до 5,0 мкл PhiX контролю в концентрації 4,0 нМ/мкл додайте 5,0 мкл 0,2 М NaOH.

Перемішайте на вортексі та центрифугуйте протягом 1 хв на максимальних обертах центрифуги-вортекса.

Інкубуйте при кімнатній температурі протягом 5 хв.

– Приготуйте базовий розчин PhiX контролю у концентрації 20 пМ/мкл:

до 990 мкл охолодженого розчину HT1 (гібридаційний розчин з набору) додайте 10,0 мкл денатурованого PhiX у концентрації 4,0 нМ/мкл.

Перемішайте розчин на вортексі.

***Важливо!***

*Пробірку з HT1 розчином під час проведення тестування постійно тримати в холодному штативі!*

*Приготований розчин PhiX контролю у концентрації 20,0 пМ/мкл може зберігатися до 12 місяців при температурі від -15 °C до -20 °C! При більш тривалому зберіганні буде знижуватись якість утворення кластерів контролю.*

– Приготуйте робоче розведення PhiX контролю у концентрації 12,5 пМ/мкл:

до 375 мкл PhiX контролю у концентрації 20,0 пМ/мкл додайте 225 мкл охолодженого розчину НТ1. Перемішайте розчин на вортексі впродовж 2–3 сек. Помістіть підготовлену пробірку з розчином PhiX контролю у концентрації 12,5 пМ/мкл у холододовий штатив.

### 3.1.7 Денатурування та розведення пулу бібліотек до 20,0 пМ

– Для денатурації пулу бібліотек в пробірку об'ємом 1,5 мл перенесіть 5 мкл підготовленого пулу бібліотек у концентрації 4,0 нМ/мкл та 5,0 мкл 0,2 М NaOH. Обережно перемішайте піпетуванням. Інкубуйте протягом 5 хв при кімнатній температурі. Додайте 990 мкл буферу НТ1. Перемішайте піпетуванням взявши дозатор на 1,0 мл.

– Розведення пулу бібліотек до кінцевої концентрації 12,0 пМ:

Об'єднайте в одній мікроцентрифужній пробірці об'ємом 1,5 мл денатурований пул бібліотек – 600 мкл, робочий розчин PhiX контролю – 10 мкл (концентрація 12,5 пМ/мкл), НТ1 буфер – 390 мкл.

Перемішайте обережно піпетуванням.

*Відкладіть готовий пул в холододовий штатив, поки не будете готові завантажити його в картридж з реагентами для секвенування.*

### 3.1.8 Документація

Супутні документи

– “Nextera XT Library preparation” Reference Guide, Document # 15031942 v05 May 2019.

– [Miseq-denature-dilute-libraries-guide-15039740-04](#).

Лист реєстрації змін

№	№ розділу, пункту стандарту, в який внесено зміни	Дата внесення змін	ПІБ співробітника, що проводив перегляд
1			

## Лист ознайомлення

Підписуючи цю сторінку, персонал та керівництво лабораторії підтверджують, що вони прочитали стандартну процедуру “Приготування Бібліотеки ДНК з використанням набору Nextera XT” та зобов’язуються виконувати описану процедуру належним чином.

№	ПІБ	Посада	Дата	Підпис
1				

Додаток 1

### Формуляр 1 Реєстрація вимірювання концентрації і якості ДНК

№ зразка	Концентрація ДНК Denovix	A260/A280	260/230	Концентрація ДНК Quantus (після екстракції)	Концентрація ДНК Quantus (готові бібліотеки)	Середня довжина фрагментів п.о.	Концентрація в нМ
1							

Додаток 2

### Формуляр 2 Реєстрація зразків, узятих для дослідження методом секвенування

Код пацієнта	1	2	3	4
Дата відбору зразка				
Місце зберігання зразка				
Дата посіву/інокуляції на живильне середовище				
Тип живильного середовища				
Дата виділення ДНК				
Метод виділення ДНК				
Спеціаліст, що виділив ДНК (ПІБ)				
Концентрація ДНК, нг/мкл (Quantus)				
Концентрація ДНК, нг/мкл (Denovix)				
Коефіцієнт 260/280				
Коефіцієнт 260/230				
Дата приготування NGS бібліотеки				
Метод приготування NGS бібліотеки				
Серійний номер набору для приготування бібліотек				
Спеціаліст, що приготував NGS бібліотеку				
Концентрація бібліотеки, нг/мкл (Quantus)				
Файл профілю (FA) бібліотеки (назва)				
Індекси i5/i7				
Місце зберігання файлу профілю (FA)				
Середній розмір бібліотеки, п.о.				
Завантажувальна концентрація, пМ				
Дата секвенування				

Тип секвенування (наприклад 2x151)				
Серійний номер проточної комірки				
Серійний номер картриджа				
Показник якості, Q30				
Кількість зчитування, млн				
Назва файлу FASTQ				
Місце зберігання файлу FASTQ				
Дата аналізу				
Спеціаліст, що виконав аналіз				
Назва програм(и) для аналізу				
Генотип				
АБ резистентність				
АБ чутливість				



## СОП 4 АНАЛІЗ РОЗМІРУ БІБЛІОТЕК З ВИКОРИСТАННЯМ ФРАГМЕНТНОГО АНАЛІЗАТОРА “FRAGMENT ANALYZER 5200”

### Мета

Описати процедуру вимірювання довжин фрагментів і концентрації ДНК для готових бібліотек ДНК з метою оцінки їх якості та кількості для подальшого використання в дослідженні методом секвенування.

### Скорочення та значення

Скорочення	Значення
ДНК	– дезоксирибонуклеїнова кислота,
NGS	– Next genome sequencing, Секвенування Нового Покоління,
WGS	– Whole Genome Sequencing, Повногеномне секвенування,
М	– моль,
Мл	– мілілітр,
Мкл	– мікролітр,
TE буфер	– ТРИС/ЕДТА буфер,
Inlet Bufer	– катодний буфер,
Capillary Storage Solution	– розчин для зберігання капілярів,
Intercalating Dye	– інтеркалюючий барвник,
Conditioning Solution	– кондиціонуючий розчин,
NGS Fragment Separation Gel	– розділювальний гель,
NGS Diluent Marker (DM)	– буфер для розведення зразків,
BF-25 Blank solution	– бланк,
TE Rinse buffer	– промивний буфер,
п.о.	– пари основ,
КЕ	– капілярний електрофорез.

### Опис

Під час проведення NGS, особливо у випадку WGS, обов'язковою умовою є використання надійної процедури контролю якості нуклеїнових кислот для отримання точних і відтворюваних результатів.

### Принцип методу

Система *Fragment Analyzer*<sup>™</sup> – прилад для капілярного електрофорезу для проведення автоматичного високоефективного розділення та кількісного

аналізу дволанцюгових нуклеїнових кислот. Розділення досягається шляхом створення електричного поля в лінійці кварцових капілярів малого внутрішнього діаметра, заповнених провідними гелевими матрицями, розробленими для розділення молекул ДНК певного розміру. Коли на лінійку капілярів подається висока напруга, ДНК/РНК мігрує крізь гелеву матрицю зі швидкістю, що залежить від довжини або розміру фрагмента; менші фрагменти мігрують швидше, ніж більші.

У кінці лінійки капілярів розділена ДНК/РНК детектується за рахунок флуоресценції чутливого інтеркалюючого барвника, присутнього в розділювальній гелевій матриці, який флуоресціює, коли зв'язується з дволанцюговими молекулами ДНК або РНК. У системі Fragment Analyzer™ використовується високоінтенсивне світлодіодне джерело збуджувального випромінювання з фокусуванням променів у оптичному вікні лінійки капілярів, флуоресценція з якого відображається на чутливий двовимірний детектор. Шляхом моніторингу інтенсивності флуоресценції, в залежності від часу, в процесі розділення методом капілярного електрофорезу за один експеримент одержують цифрові зображення електрофореграм, що показують вміст ДНК/РНК у 12 зразках.

Аналізатор фрагментів виключає більшість ручних процедур шляхом автоматизації ключових кроків процесу. Програмне забезпечення аналізу даних PROSize дозволяє здійснювати аналіз розмірів фрагментів автоматично, а також дозволяє швидко і надійно отримувати результати внутрішнього контролю якості зразків і процедури, що проводиться. Даний метод має вищу продуктивність і точність аналізу у порівнянні з методом електрофорезу в агарозному гелі.

### **Матеріал**

Отримані зразки бібліотек.

### **Прилади**

- Аналізатор фрагментів (Fragment Analyzer 5200)
- Мікроцентрифуга з ротором для 96-лункових плашок

- Вортекс з можливістю перемішування у 96-лункових плашках
- Автоматичні 8-канальні та 1-канальні дозатори зі змінним об'ємом 0,5–10 мкл; 10–100 мкл; 20–200 мкл.

### **Реагенти, витратні матеріали**

- Набір для фрагментного аналізатора HS NGS Fragment Kit (1-6000 п.о.), 500 зразків (DNF474-FR+DNF475-0050+5191-6578)
- 100X TE-буфер
- Ультрарачиста вода
- Розчин NaOH 0,5 М
- Мінеральне масло
- Плашки для зразків/Маркувальні плашки (*Bio Rad Hard-Shell High-Profile PCR plates*)
- Стриповані пробірки для ПЛР об'ємом 0,2 мл
- Пробірки типу “Фалькон” об'ємом 50,0 мл
- Розчин для зберігання капілярів (*Capillary Storage Solution*), 100 mL;
- Одноразові плашки для буфера і відходів (*Buffer/Waste Deep 96-Well Plates*)
- Наконечники з аерозольним фільтром для автоматичних піпеток на 10 мкл, 100 мкл, 200 та 1000 мкл
- Клейка плівка для 96-лункових плашок
- Мірний градуйований циліндр об'ємом 50,0–100 мл.

## **4.1 Проведення**

Всі реагенти, що будуть використовуватися для аналізу повинні бути кімнатної температури, якщо інше не передбачено інструкцією використання від виробника реагентів. Зберігання та використання готових реагентів повинно відбуватися згідно інструкцій виробника.

### **4.1.1 Підготовка розділювального гелю**

- а) Дістаньте реагенти з холодильника і доведіть їх до кімнатної

температури (NGS Fragment Separation Gel зберігається при +4 °С, інтеркалюючий барвник Intercalating Dye при -20 °С);

- b) Промаркуйте пробірку типу “Фалькон” (50,0 мл) – “NSG Gel”;
- c) За допомогою мірного циліндра перенесіть в пробірку “NSG Gel” необхідну кількість NGS Fragment Separation Gel, відповідно до кількості зразків, що тестуються. Кількість реагентів для різної кількості зразків вказані в табл. 1;
- d) Додайте необхідну кількість інтеркалюючого барвника Intercalating Dye з розрахунку 1,0 мкл на 10,0 мл гелю NGS Fragment Separation Gel;
- e) Перемішайте, обережно перевертаючи “фальконівську” пробірку: уникайте утворення бульбашок і піни.

***Важливо!***

*Для отримання максимальної чутливості суміш рекомендується готувати в день проведення дослідження, оскільки з часом чутливість детекції знижується. Не рекомендується використовувати суміш гелю/барвника, яка приготована понад два тижні тому.*

Таблиця 1 –Об’єми реагентів для проведення фрагментного аналізу

Кількість зразків	Об’єм Intercalating Dye	Об’єм NGS Fragment Separation Gel	Об’єм 1x Conditioning Solution
12	1,0 мкл	10,0 мл	10,0 мл
24	1,5 мкл	15,0 мл	15,0 мл
36	2,0 мкл	20,0 мл	20,0 мл
48	2,5 мкл	25,0 мл	25,0 мл
96	4,5 мкл	45,0 мл	45,0 мл

#### **4.1.2 Підготовка Inlet Buffer (Катодного буфера)**

- a) Дістаньте буфер 5x 930 dsDNA із холодильника і доведіть його до кімнатної температури;
- b) У чистий флакон перенесіть 20,0 мл вихідного буфера 5x 930 dsDNA та 80,0 мл ультрачистої води. Перемішайте.
- c) Можна за бажанням увесь флакон (125 мл) змішати з водою, довівши розчин до 1-кратної концентрації та зберігати при +4 °С.

### **4.1.3 Підготовка розчину для капілярного кондиціонування (Capillary Conditioning Solution)**

Приготуйте розведення 1xConditioning solution (кондиціонуючого розчину) в кількості, що відповідає кількості взятого гелю NGS Fragment Separation Gel (табл. 1).

Наприклад: для 12 зразків необхідно 10,0 мл 1x кондиціонуючого розчину.

Для отримання 1x кондиціонуючого розчину необхідно розвести 2,0 мл 5xConditioning solution у 8,0 мл деіонізованої води;

для 24 зразків: 3,0 мл (5xConditioning solution) + 12,0 мл (ультрачистої води);

для 36 зразків: 4,0 мл (5xConditioning solution) + 26,0 мл (ультрачистої води);

для 48 зразків: 5,0 мл (5xConditioning solution) + 25,0 мл (ультрачистої води);

для 96 зразків: 9,0 мл (5xConditioning solution) + 36,0 мл (ультрачистої води).

Можна за бажанням увесь флакон (125 мл) змішати з водою, довівши розчин до 1-кратної концентрації та зберігати при кімнатній температурі.

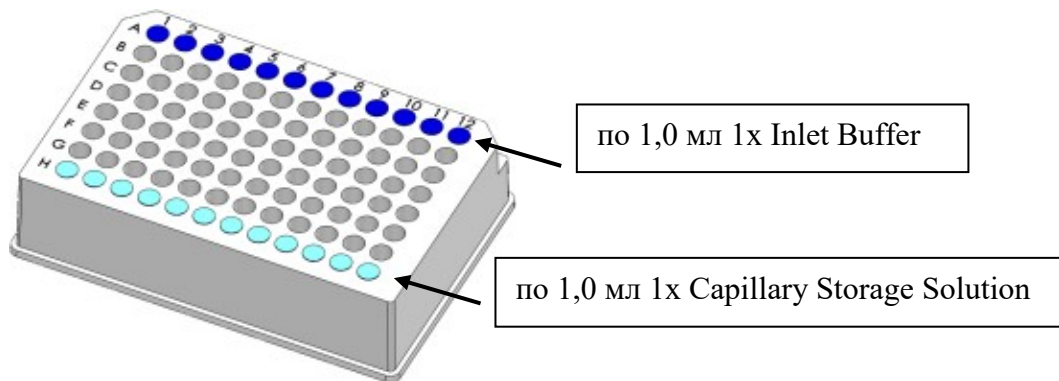
### **4.1.4 Підготовка плашки для буферів**

Візьміть нову 96 лункову плашку з об'ємом лунки 1,0 мл для Inlet Buffer і для розчину для зберігання капілярів (Capillary Storage Solution).

Внесіть в кожну лунку ряду А по 1,0 мл 1x Inlet Buffer (верхній ряд, позначений синім кольором на малюнку); змінюйте його щодня.

В кожну лунку ряду Н (нижній ряд, позначений світло-блакитним кольором на малюнку) внесіть по 1,0 мл 1x Capillary Storage Solution; змінюйте його раз на тиждень.

**Ряд А і Н повинні бути завжди заповнені відповідними буферами!!!**



#### **4.1.5 Підготовка маркера молекулярних мас та зразків**

- Підготуйте пляшку для зразків, сумісну з аналізатором фрагментів і рекомендовану виробником.
- Перед використанням доведіть розчини NGS Diluent Marker (DM) та NGS DNA Ladder до кімнатної температури. Покрутіть та перегляньте пробірки після розморожування, щоб переконатися, що рідина знаходиться на дні пробірки.
- Підготуйте ПЛР-пляшку для зразків. В кожну лунку внесіть по 22,0 мкл розчину NGS Diluent Marker(DM);
- Пробірки з підготовленими бібліотеками перемішайте на вортексі (2–3 сек) і осадіть центрифугуванням краплі з кришок;
- Внесіть по 2,0 мкл підготовлених бібліотек в лунки з DM; в останню 12-ту лунку внесіть 2,0 мкл маркера молекулярних мас – NGS DNA Ladder (задана коротка послідовність азотистих основ з відомою довжиною);
- Закрийте клейкою плівкою пляшку, ретельно натиснувши, щільно приклейте;
- Перемішайте на вортексі пляшку зі зразками впродовж 2 хв;
- Вкладіть підготовлену пляшку в спеціальні штативи для центрифугування і центрифугуйте протягом 5 сек при 1000 об/хв; зніміть плівку з пляшки. Перевірте лунки планшета для зразків, щоб переконатися, що на дні лунок немає бульбашок повітря.
- Якщо використовується більше ніж 3 ряди, додайте по 1 краплі

мінерального масла в лунки із зразками, щоб уникнути випаровування (мінеральне масло можна додати одразу з флакона з маслом, по 1 краплі без використання піпеток);

- Усі лунки кожного використаного ряду повинні бути зайняті, якщо зразків на ряд не вистачає, внесіть в ці лунки 24,0 мкл розчину BF-25;
- Вкладіть плашку із зразками в один з трьох відсіків фрагментного аналізатора для зразків. Підготовлена плашка ретельно накрита плівкою може зберігатися при +4 °С, але краще використовувати її якомога швидше.

#### **4.1.6 Підготовка фрагментного аналізатора до роботи**

- Перевірте рівень рідини у флаконі для відходів і лотку для відходів. Спорожніть їх у разі потреби.
- Виберіть і натисніть “Park” і почекайте, поки програма перемістить плашку з положення зберігання в паркувальне положення;
- Вкладіть підготовлену плашку у відсік В фрагментного аналізатора. Зверніть увагу, що при завантаженні плашки її лунка A1 має розташовуватися зліва в задній частині відсіку;
- Встановіть капіляри в розчин для зберігання капілярів, обравши в програмному забезпеченні команду “Store”;
- Замініть пробірки з NGS гелем і 1x Conditioning solution з попереднього запуску на нові, такого ж об’єму (50,0 мл). Кінець трубки подачі рідини має перебувати на дні конічної пробірки для уникнення утворення бульбашок повітря, що можуть заважати подачі рідини під тиском. Вміст попередніх пробірок утилізуйте. Якщо кількість кондиціонуючого розчину недостатня під час старту, програма видасть помилку “об’єм розчину дуже маленький”;
- Перевірте та відкоригуйте рівні розчинів: необхідно зайти в програму у вкладку “utilities” – “solution levels” і внести взяту кількість розчинів, натиснути «ок»;
- Помістіть порожню плашку 96 DeepWell з об’ємом лунки 1,0 мл у

відсік “W” (другий зверху) аналізатора фрагментів. Ця плашка служить лотком для відходів і повинна спорожнітися щодня;

– Внесіть по 200 мкл 0,25X TE Rinse buffer (промивний буфер) в лунки верхніх перших рядів маркувальної плашки (marker plate) відповідно до кількості зразків. Підкресліть маркером ряди, що використали, і поряд напишіть дату використання, щоб виключити повторне використання лунок (Плашку можна використовувати кілька разів, поки не будуть використані всі лунки). Закрийте плашку плівкою, перемішайте на вортексі 3–4 сек і осадіть центрифугуванням (5 сек при 1000 об/хв). Зніміть плівку і вставте маркувальну плашку у відсік M.

#### **4.1.7 Запуск електрофорезу та облік результатів**

1) Щоб підготувати запуск, на головному екрані програмного забезпечення Fragment Analyzer виберіть вкладку Operation. Оберіть розташування лотка для зразків, яке потрібно проаналізувати (1, 2 або 3).

2) Клацніть лівою кнопкою миші лунку потрібного ряду плашки із зразками. Вибраний рядок буде виділено на схемі плашки. Введіть назву зразка у відповідну клітинку з ідентифікатором зразка, клацнувши лівою кнопкою миші клітинку та ввівши назву.

3) Після введення інформації про зразок рядка або плашки в полі “Виконати вибрану групу” (Run Selected Group) натисніть “Додати до черги” (Add to queue). Відобразиться форма Separation Setup, яка дозволить користувачеві вибрати експериментальний метод та ввести додаткову інформацію.

4) У спливаючому вікні “Налаштування розділення” (Separation Setup) клацніть спадаюче меню лівою кнопкою миші та виберіть відповідний попередньо завантажений файл експериментального методу.

5) Доступні методи відсортовані за номером комплекту та пов’язані з каталогом, який містить методи для поточної встановленої довжини капілярної решітки (33 см).



Оберіть метод у випадяючому меню (в нашому випадку DNF-474-33 - HS NGS Fragment 1-6000bp.mthds). Довжина капілярів вказана на упаковці капілярів що використовується в приладі.

6) У випадяючому меню оберіть відповідну лінію гелю, що використовується для експерименту (гель 1 або гель 2).

7) Для ідентифікації плашки для зразків можна ввести назву секції.

8) Щоб скопіювати результати експерименту в інше розташування на додаток до каталогу збереження за замовчуванням, установіть прапорець «Копіювати результати» та виберіть потрібний для копіювання шлях.

9) Після введення всієї інформації натисніть ОК, щоб додати метод до черги.

10) Повторіть кроки 2–10 для всіх рядків зразків, які залишилися для аналізу.

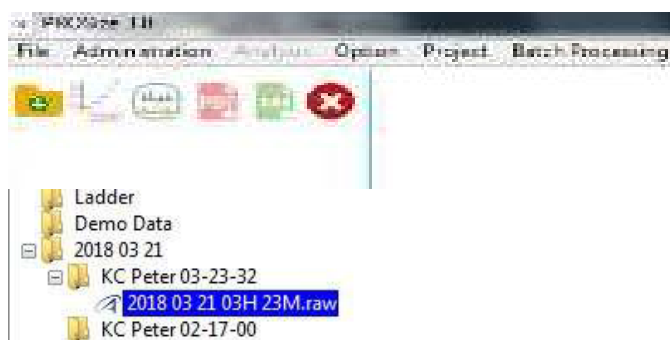
11) Перед запуском електрофорезу перевірте, чи всі лотки (буфер для зберігання, промивка, відходи, зразок тощо) завантажено у відповідні місця секцій.

12) Натисніть значок “Відтворити” (Play), щоб розпочати тестування, завантажене в чергу.

13) Після завершення тесту капіляри автоматично перемістяться до місця зберігання (рядок N вхідного буферного лотка, що містить розчин для зберігання капілярів).

#### 4.1.8 Обробка експериментальних даних

– Відкрийте свої дані, вибравши відповідний файл з розширенням .raw. і натисніть “Open”.



– Під час обробки даних програмне забезпечення для аналізу даних ProSize автоматично розпізнає виконаний метод поділу та застосує відповідний файл конфігурації з каталогу C:\PROSize 3.0\Configurations:

*Метод розділення DNF-474-33 буде оброблено за допомогою файлу конфігурації DNF-474-33 – HS NGS Fragment 1-6000n.o.*

– Дані нормалізуються відповідно до нижнього маркера (1 п.о.) і верхнього маркера (6 000 п.о.) і калібруються на NGS DNA Ladder паралельно зі зразками. Всього маємо побачити 16 піків. На кожному піку позначено довжину фрагментів п.о.-синім. Вісь Y демонструє RFU (інтенсивність флуоресценції), вісь X відповідно – розмір фрагментів та їх розташування на електрофореграмі за часом.

На рис. 1 показано приклад маркерів 1 п.о. та 6000 п.о., введених за допомогою NGS DNA Ladder. Всього має бути 16 піків.

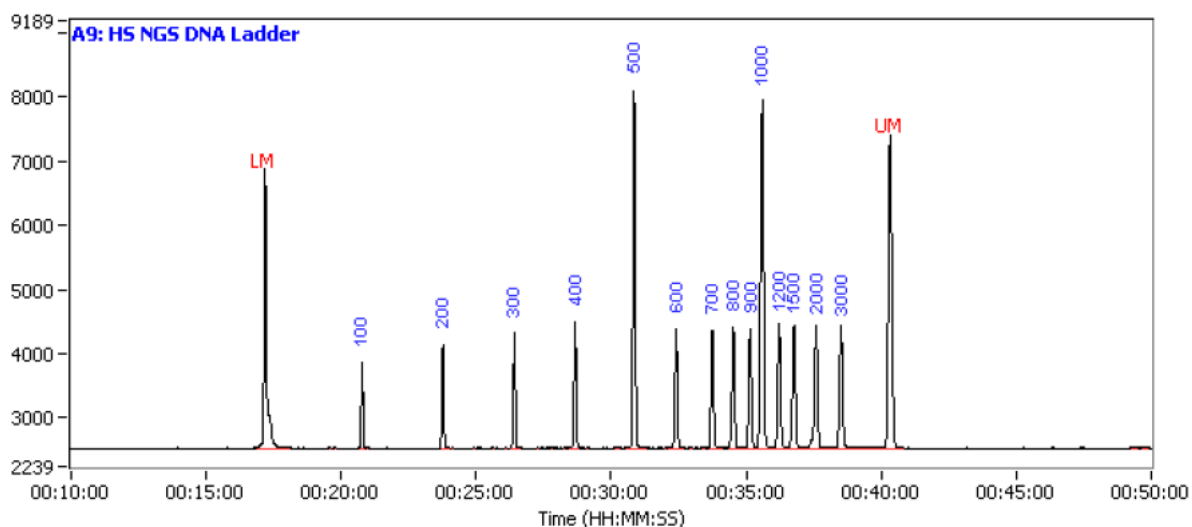


Рис. 1. Маркер молекулярної ваги від 1 п.о. та 6000 п.о.

На рис. 2 показаний типовий результат для зразка ДНК.

Результати визначення будуть обраховані автоматично та подані у таблиці (рис. 3).

Деталі розміру та концентрації можна переглянути в Peak Table (таблиця піків), в якій вказано концентрація в наномолях, а також **Avg.Size** (середній розмір фрагментів) інформація необхідна для перерахунку нг/мкл в нМ/мкл

(див. СОП 5). Також на електрофореграмі можемо оцінити якість приготованих бібліотек за розміром. Оптимальна бібліотека повинна входити в діапазон між 300 та 1000 п.о. Ідеально 500 п.о.

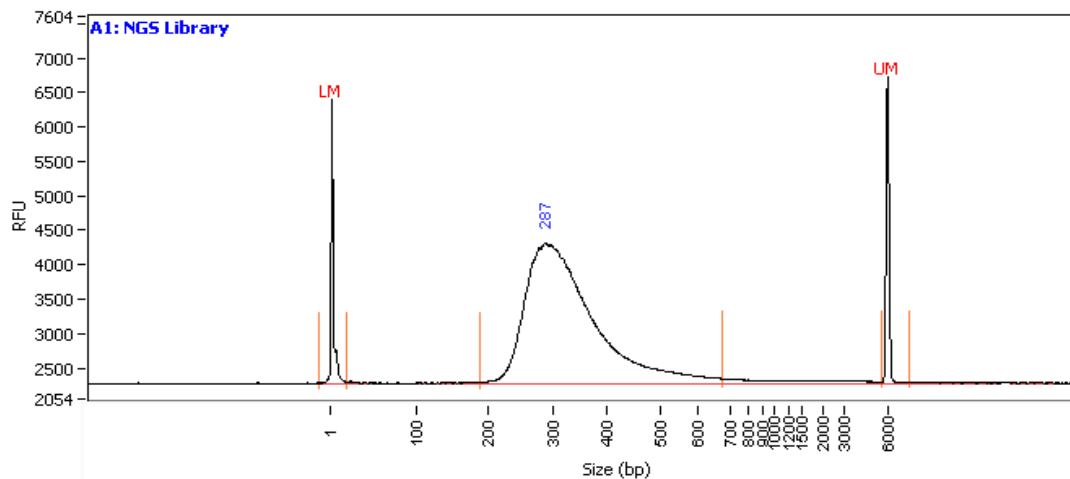


Рис. 2. Типова електрофореграма для зразка ДНК, виконана на фрагментному аналізаторі.

Peak Table								
	Size (bp)	ng/uL	% (Conc.)	nmole/L	From (bp)	To (bp)	Avg. Size	CV%
1	287	2.2975	100.0	13.175	187	676	333	23.42
	TIC:	2.2975		13.175				
	Total Conc.	2.3684						

Рис. 3. Таблиця результатів аналізу електрофореграми зразка ДНК.

- Отримані результати концентрації нг/мкл внесіть в Формуляр Реєстрації зразків, узятих для дослідження методом секвенування (додаток 2).
- Щоб отримати повну інформацію щодо обробки даних, зверніться до посібника користувача ProSize.

#### 4.1.9 Документація

Супутні документи

- Посібник користувача генетичного аналізатора FRAGMENT ANALYZER™ версія 1.1.0.11.
- HS NGS Fragment kit (1-6000 bp), 500 Samples (Part # DNF-474-0500).

Лист реєстрації змін

№	№ розділу, пункту СОП, в який внесено зміну	Дата внесення зміни	ПІБ співробітника, що проводив перегляд
1			

Лист ознайомлення

Підписуючи цю сторінку, персонал і керівництво лабораторії підтверджують, що вони прочитали стандартну операційну процедуру “Аналіз розміру бібліотек з використанням фрагментного аналізатора *Fragment Analyzer 5200*” і зобов’язуються виконувати описану процедуру належним чином.

№	ПІБ	Посада	Дата	Підпис
1				

Додаток 1

Формуляр Реєстрація зразків, узятих для дослідження методом секвенування

Код пацієнта	1	2	3	4
Дата відбору зразка				
Місце зберігання зразка				
Дата посіву/інокуляції на живильне середовище				
Тип живильного середовища				
Дата виділення ДНК				
Метод виділення ДНК				
Спеціаліст, що виділив ДНК (ПІБ)				
Концентрація ДНК, нг/мкл (Quantus)				
Концентрація ДНК, нг/мкл (Denovix)				
Коефіцієнт 260/280				
Коефіцієнт 260/230				
Дата приготування NGS бібліотеки				
Метод приготування NGS бібліотеки				
Серійний номер набору для приготування бібліотек				
Спеціаліст, що приготував NGS бібліотеку				
Концентрація бібліотеки, нг/мкл (Quantus)				
Файл профілю (FA) бібліотеки (назва)				
Індекси i5/i7				
Місце зберігання файлу профілю (FA)				
Середній розмір бібліотеки, п.о.				
Завантажувальна концентрація, пМ				
Дата секвенування				
Тип секвенування (наприклад 2x151)				
Серійний номер проточної комірки				
Серійний номер картриджа				

Показник якості, Q30				
Кількість зчитування, млн				
Назва файлу FASTQ				
Місце зберігання файлу FASTQ				
Дата аналізу				
Спеціаліст, що виконав аналіз				
Назва програм(и) для аналізу				
Генотип				
АБ резистентність				
АБ чутливість				

## СОП 5 ЗАПУСК СЕКВЕНУВАННЯ НА ПЛАТФОРМІ ILLUMINA MISEQ

### Мета

Описати послідовність запуску секвенування геному мікобактерій туберкульозного комплексу з допомогою Illumina MiSeq®.

### Скорочення та значення

Скорочення	Значення
ДНК	– дезоксирибонуклеїнова кислота,
ПЛР	– полімеразна ланцюгова реакція,
нМ	– наномоль,
мМ	– мілімоль,
рН	– кислотність розчину,
Мл	– мілілітр,
Мкл	– мікролітр
°С	– температура за Цельсієм,
ID	– ідентифікаційний номер,
М	– моль,
рМ	– пікомоль,
RBS	– буфер для змішування.

### Опис

Секвенування геному *M. tuberculosis* дозволяє визначити належність виділеного ізоляту до певного варіанту генотипу, а також визначити наявність мутацій у виділеному ізоляті та ймовірну лікарську стійкість до певних антибіотиків.

### Принцип методу

Система Illumina MiSeq® поєднує надійну технологію секвенування за допомогою синтезу (sequencing by synthesis, SBS) з принципово новою організацією робочого процесу, що дозволяє лише за кілька годин отримати проаналізовані дані з ДНК. Система MiSeq поєднує генерацію кластерів та секвенування в одному приладі.

### Матеріал

Бібліотеки ДНК, приготовані за допомогою набору Nextera XT, об'єднані в один пул, денатуровані та розведені до 12 пМ/мкл (див. СОП 3).

### **Прилади**

- MiSeq Illumina (65015510002)
- Мікроцентрифуга
- Вортекс-центрифуга
- Резервуар для розморожування картриджа у воді (пластикові ємність 30x50 см)
- Набір автоматичних дозаторів: 0,5–10 мкл, 20–200 мкл, 100–1000 мкл
- Ємність для промивання проточної кювети об'ємом 250 мл
- Ємність для промивання приладу (входить до комплектації приладу)
- Штативи для роботи з пробірками в холодних умовах (Cool Rack).

### *Реагенти, витратні матеріали*

- Набір MiSeq<sup>®</sup> Reagent Micro Kit v2 (300 циклів),(15033624+15036715)
- 0,5 % Tween 20
- Ультрарістична вода для молекулярних досліджень
- Пластикові одноразові мікропробірки об'ємом 1,5 мл
- Наконечники одноразові 10 мкл; 100 мкл; 200 мкл; 300 мкл; 1000 мкл

### *Контролі*

Для внутрішнього контролю якості використовується PhiX контроль.

## **5.1 Проведення**

### **5.1.1 Підготовка обладнання та реагентів**

Увімкніть прилад: переведіть перемикач живлення в задній частині приладу у положення вкл., дочекайтесь повної перевірки та загрузки системи, увійдіть в операційну систему.

Під час завантаження операційної системи керуюче програмне забезпечення MiSeq Control Software (MCS) запускає та ініціалізує систему автоматично. Якщо у програмному забезпеченні Local Run Manager активовано

керування користувачами, увійдіть до системи, використовуючи ім'я користувача та пароль для Local Run Manager, а потім натисніть Next (Далі).

Секвенатор Miseq перед кожним запуском повинен бути промитий:

Натисніть на головній сторінці секвенатора **RUN OPTION**, далі виберіть **RUN SETTING** далі натисніть **Maintenance Wash**. За допомогою програмного забезпечення сіперні трубки в холодильнику для реактивів автоматично піднімуться.

1. Приготуйте свіжий розчин для промивання (0,5 % Tween 20). Спочатку приготуйте 10,0 % розчин Tween 20, додавши до 45,0 мл ультрачистої води 5,0 мл 100 % Tween 20.

Перенесіть 25,0 мл 10,0 % розчину Tween 20 до колби з 475 мл ультрачистої води перелийте в чистий флакон об'ємом 1 л, перемішайте перевертанням.

2. Приготуйте штатив для промивання: помістіть у кожну лунку по 6,0 мл розчину для промивання; додайте 350 мл розчину для промивання в ємність для промивання (об'єм 500 мл) Перемішайте шляхом перевертання флакона 5 разів.

3. Перевірте, чи використана проточна комірка завантажена в прилад.

4. Відкрийте дверцята до відсіку для реагентів. Видаліть картридж з реагентами, а на його місце встановіть ємність для промивання потім закрийте дверцята. Підніміть сіперну ручку біля флакона з розчином для промивання та ємністю для відходів поки вона не зафіксується. Замініть флакон з розчином PR2 ємністю з щойно приготованим розчином для промивання 0,5 % Tween 20. Перевірте щоб ємність для відходів була порожня. Якщо потрібно видаліть рідину з ємності для відходів у каністру для небезпечних хімічних відходів. Опустіть сіперну ручку. Закрийте дверцята.

5. Натисніть Next. Почнеться перша промивка.

Повторіть процедуру промивки тричі.

**Важливо!**



*На кожному етапі промивання необхідно завжди використовувати свіжий розчин для промивання.*

### 5.1.2 Розморожування картриджа з реагентами

- Дістаньте з морозильної камери (-25 °C -15 °C) картридж із реагентами та помістіть його у ємність з дистильованою водою при кімнатній температурі. Рівень води в ємності не повинен перевищувати спеціальну лінію нанесену на картриджі (тримати у воді близько 1 години);

#### ***Важливо!***

*Реактиви можна розморозити впродовж ночі за температури від 2 до 8 °C. При зберіганні за температури холодильної камери (від +2 до +8 °C) реактиви залишаються стабільними до одного тижня.*

- Проточну комірку залиште при кімнатній температурі на 30 хв.

### 5.1.3 Створення таблиці зразків на MiSeq

- Відкрийте вкладення “Illumina Experiment Manager”;
- Натисніть Next;
- Create Sample Sheet;
- Next;
- Press Miseq;
- Next;
- Other;
- FastQ Only;
- Next;
- Введіть штрих-код з картриджу;
- Виберіть набір, що використовується (Library Prep Kit);
- В полі “Experiment Name” вкажіть номер експерименту (циклу);
- В полі “Investigator Name” вкажіть ім’я співробітника, що проводить тестування;
- Виберіть “Read Type” (**Paired End**);

- Виберіть кількість циклів;
- Next;
- Нажміть на поле “add blank row” стільки разів скільки зразків береться на дослідження;

- Внесіть ID зразків;
- Внесіть номери індексів 1;
- Внесіть номери індексів 2;
- Finish.

Якщо все правильно було вписано програма укаже, що все правильно внесено і можна продовжити цикл.

#### **5.1.4 Завантаження картриджа в MiSeq**

- Дістаньте картридж з ємності з водою, де картридж розморожувався. Струсіть воду обережним постукуванням картриджа по поверхні, покритій паперовою серветкою;
- Перемішайте вміст відсіків картриджа обережним перевертанням кілька разів;
- Перевірте відтаювання рідин у всіх відсіках картриджа, переглянувши його під потоком світла;
- Наберіть 600 мкл пулу бібліотек з кінцевою концентрацією 12 пМ/мкл та обережно без бульбашок перенесіть його у відсік картриджа, призначений для бібліотек помічений червоним кольором;
- Обережно промийте проточну комірку ультрачистою водою, направляючи сопло промиваючого флакона безпосередньо на комірку;
- Ретельно її просушить безворсовою серветкою;
- Вкладіть проточну комірку у відповідний відсік секвенатора;
- Видаліть рідину з ємності для відходів у каністру для небезпечних хімічних відходів;
- Встановіть на це місце новий флакон з буфером із набору;

- Відкрийте відсік для картриджа, вийміть звідти картридж для промивання, за необхідності просушіть серветкою відсік і вставте картридж із зразками, закрийте відсік. Перевірте, чи легко рухається картридж у відсіку;
- Перевірте дані створеного до цього протоколу зразків у Illumina Experiment Manager;
- Дочекайтеся, коли система завершить перевірку та натисніть “Start”;

Розпочнеться процес секвенування.(Тривалість секвенування при використанні картриджу типу MiSeq Reagent Kit v2 Micro буде становити приблизно 19 годин).

Для детального моніторингу ходу виконання циклу можна використовувати екран приладу Sequencing (Секвенування). Екран Sequencing призначений тільки для перегляду даних.

- Параметри оцінки якості секвенування для MiSeq (Картридж – MiSeq Reagent Kit v2 Micro)

Read Length: 2 × 150 bp

Output: 1,2 Gb

Quality scores > 80,0 % bases higher than Q30 at 2 × 150 bp

Cluster density 1000 – 1200 k/mm<sup>2</sup>

***Важливо!***

*Файли даних секвенування мають бути у стиснутому форматі FASTQ (.fastq.gz).*

Подальший аналіз залежить від обсягу експерименту і повинен проводитися разом з фахівцями з біоінформатики.

Для WGS, фахівці з біоінформатики можуть використовувати, наприклад, веб-сервіс Phylo-Resistance Search Engine (PhyResSE), доступний за адресою <https://phyresse.org/> Це інструмент, який автоматично визначає класифікацію філогенетичної лінії та опосередковані резистентністю варіанти видів, що належать до комплексу *M. tuberculosis*, шляхом обробки файлів FastQ, згенерованих секвенатором MiSeq.

Після завершення програми секвенування якнайшвидше проведіть післяциклове промивання машини підготувавши розчин для промивання, як описано в п.4.1 цього документу.

Натисніть на головній сторінці секвенатора RUN OPTION, далі виберіть RUN SETTING, далі POST RUN WASH після чого натисніть START WASH. Це призведе до підймання сіперних трубок у холодильнику для реагентів (частина приладу). Відкрийте дверцята до відсіку реагентів. Заберіть картридж з реагентами на його місце встановіть ємність для промивання потім закрийте дверцята. Підніміть сіперну ручку біля флакона розчину PR2 та ємності для відходів поки вона не зафіксується. Замініть флакон з PR2 на флакон з буфером для промивки. Перевірте щоб ємність з відходами була порожня. Якщо потрібно видаліть рідину з ємності для відходів у каністру для небезпечних хімічних відходів. Опустіть сіперну ручку. Закрийте дверцята.

Натисніть на екрані NEXT.

#### **Після закінчення промивання повністю відключіть MiSeq**

- Використовуйте функцію Shutdown;
- Вимкніть MiSeq кнопкою на передній панелі інструменту;
- Вимкніть кнопку на задній панелі MiSeq.

#### **5.1.5 Документація**

Супутні документи

Керівництво від Illumina: Керівництво з експлуатації-15027617-01.

Лист реєстрації змін

№	№ розділу, пункту стандарту, до якого внесено зміни	Дата внесення змін	ПІБ співробітника, який проводив ревізію
1			

Лист реєстрації ознайомлення

Підписуючи цю сторінку, персонал та керівництво лабораторії підтверджують, що вони прочитали стандартну процедуру “Запуск

секвенування на платформі Illumina MiSeq” та зобов’язуються виконувати описану процедуру належним чином.

№	ПІБ	Посада	Дата	Підпис
1				

Додаток 1

Формуляр Реєстрація зразків, узятих для дослідження методом секвенування

Код пацієнта	1	2	3	4
Дата відбору зразка				
Місце зберігання зразка				
Дата посіву/інокуляції на живильне середовище				
Тип живильного середовища				
Дата виділення ДНК				
Метод виділення ДНК				
Спеціаліст, що виділив ДНК (ПІБ)				
Концентрація ДНК, нг/мкл (Quantus)				
Концентрація ДНК, нг/мкл (Denovix)				
Коефіцієнт 260/280				
Коефіцієнт 260/230				
Дата приготування NGS бібліотеки				
Метод приготування NGS бібліотеки				
Серійний номер набору для приготування бібліотек				
Спеціаліст, що приготував NGS бібліотеку				
Концентрація бібліотеки, нг/мкл (Quantus)				
Файл профілю (FA) бібліотеки (назва)				
Індекси i5/i7				
Місце зберігання файлу профілю (FA)				
Середній розмір бібліотеки, п.о.				
Завантажувальна концентрація, пМ				
Дата секвенування				
Тип секвенування (наприклад 2x151)				
Серійний номер проточної комірки				
Серійний номер картриджа				
Показник якості, Q30				
Кількість зчитування, млн				
Назва файлу FASTQ				
Місце зберігання файлу FASTQ				
Дата аналізу				
Спеціаліст, що виконав аналіз				
Назва програм(и) для аналізу				
Генотип				
АБ резистентність				
АБ чутливість				

# СОП 6 АНАЛІЗ ФАЙЛІВ ДАНИХ FASTQ ЗА ДОПОМОГОЮ БІОІНФОРМАТИЧНОГО ІНСТРУМЕНТУ MTBSEQ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ГЕНОТИПУ ТА ВИЯВЛЕННЯ МУТАЦІЙ У ГЕНАХ, АСОЦІЙОВАНИХ З РЕЗИСТЕНТНІСТЮ ДО ПРОТИТУБЕРКУЛЬОЗНИХ ПРЕПАРАТІВ ПРИ ПОВНОГЕНОМНОМУ СЕКВЕНУВАННІ

## Мета

Описати стандартну послідовність обробки даних, отриманих при повногеномному секвенуванні ізолятів мікобактерій туберкульозного комплексу (МБТК) за допомогою біоінформатичного інструменту MTBseq.

## Скорочення та значення

Скорочення	Значення
ДНК	– дезоксирибонуклеїнова кислота,
МБТ	– мікобактерія туберкульозу ( <i>Mycobacterium tuberculosis</i> ),
МБТК	– мікобактерії туберкульозного комплексу
ПГС	– повногеномне секвенування,
Картування (mapping)	– пошук відносних положень і лінійного порядку генів у хромосомі,
Визначення варіантів (variant calling)	– процес виявлення відмінностей між еталонним геномом і геномом особи, що досліджується,
СНП	– секвенування Наступного Покоління,
Зчитування (Reads)	– визначена послідовність пар основ або імовірність пар основ, що відповідає всьому або частині одного фрагмента ДНК,
фОНП(pSNP)	– філогенетичні одонуклеотидні поліморфізми. Одонуклеотидний поліморфізм (англ. Single nucleotide polymorphism, SNP) – гетерогенність первинної структури ДНК, що виявляється в одонуклеотидних (точкових) відмінностях алелей,
Алельні гени, алелі	– парні гени, що займають одні й ті самі локуси гомологічних хромосом і визначають альтернативні взаємовиключні стани тієї самої ознаки. Трапляються в межах однієї популяції організмів та визначають різні фенотипи цих організмів,

FASTA	– текстовий формат для нуклеотидних послідовностей.
-------	---

### Опис

MTBseq – це автоматизований інструмент для картування, визначення варіантів і виявлення резистентності та філогенетичних варіантів на основі даних повногеномних послідовностей ізолятів *Mycobacterium tuberculosis* complex, отриманих за допомогою технології Illumina.

MTBseq поєднує всі необхідні етапи для аналізу даних СНП штамів МБТК, починаючи від картування зчитувань до виявлення варіантних положень основ, асоційованих із стійкістю до антибіотиків, і класифікації ліній на основі філогенетичних одонуклеотидних поліморфізмів (фОНП).

Інструмент складається з програмного забезпечення з відкритим вихідним кодом для картування зчитувань (SAMTOOLS, BWA), повторного калібрування та уточнення базових послідовностей (PICARD, GATK) і визначення варіантів (SAMTOOLS).

Крім того, за допомогою MTBseq можна провести порівняльний аналіз варіантів для декількох зразків, визначаючи ймовірні споріднені зразки за відстанню рами нуклеотидів та будуючи вирівнювання інформативних позицій варіантів у форматі FASTA, який може бути використаний для побудови філогенетичних дерев.

Загальна схема інструменту (рис. 1).

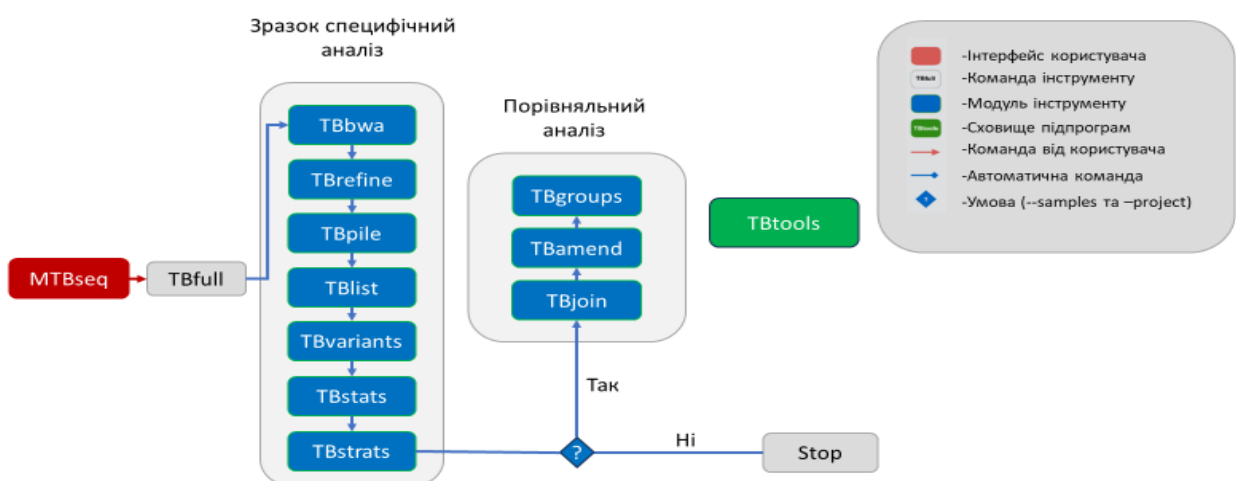


Рис.1. Схематичне зображення інструменту MTBseq.

Після запуску MTBseq створює власне робоче середовище. Це середовище складається зі спеціальних папок для різних вихідних файлів, створених під час виконання аналізу, в робочому каталозі. З повним списком команд (Значення та опції) можна ознайомитись в онлайн інструкції до інструменту MTBseq за посиланням (див. Супутні документи).

### **Принцип роботи інструменту**

В основу роботи інструменту покладено порівняння отриманих послідовностей ДНК з послідовністю референсного штаму *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv (NC\_000962.3). Інструмент використовує геном цього штаму для картування, визначення варіантів та їх опису.

### **Матеріал**

Вхідними даними для MTBseq є дані СНП в форматі файлів FASTQ парні або односторонні.

### **Прилади**

Комп'ютер з встановленою операційною системою Linux та інсталюваним MTBseq; рекомендований об'єм оперативної пам'яті 20 – 25 Гб або більше; розмір жорсткого диску від 1 Тб.

### **6.1 Алгоритм виконання**

1. На диску «D» комп'ютера, де встановлено робочий інструмент MTBseq, створити окрему папку. Називати її MTBseq. У ній створити ще одну папку, для назви якої використати дату проведення секвенування – D:/MTBseq/дата секвенування. Наприклад, D:/MTBseq/22112023.

2. Скопіювати FASTQ файли з секвенатора і за допомогою USB-накопичувача перенести їх ПК, де встановлений інструмент у створену папку D:/MTBseq/(дата секвенування).

#### ***Важливо!***

*Шлях до файлів в персональному секвенаторі MiSeq:  
D:\Illumina\MiSeqAnalysis  
(or MiSeqOutput)[RunFolderName]\Alignment\_1[autogenerated folder with date  
and time when analysis started]\Fastq*



3. Перейменувати скопійовані файли відповідно до вимог.

**Важливо!**

Назви скопійованих FASTQ файлів повинні бути англійською мовою, мати відповідну структуру, не містити ніяких спеціальних символів, окрім дефісів, і містити принаймні три поля розділених символами підкреслення.

[SampleID]\_[LibID]\_[\*]\_[Direction].fastq.gz, де

[SampleID] – ідентифікатор певного бактеріального зразка,

[LibID] – ідентифікатор використаної бібліотеки СНП,

[Direction] – інформація про напрямок зчитування: прямий (R1) чи зворотній (R2).

Крім того, назва файлу може містити додаткові поля [\*].

Дозволені розширення файлів FASTQ – fastq.gz

Отже, із назви скопійованого файлу FASTQ треба видалити усі знаки після даних про напрямок зчитування.

Наприклад: 438\_S1\_L001\_R1\_001.fastq.gz → 438\_S1\_L001\_R1.fastq.gz

4. З цієї ж папки в адресний рядок вписати команду bash (рис. 2).

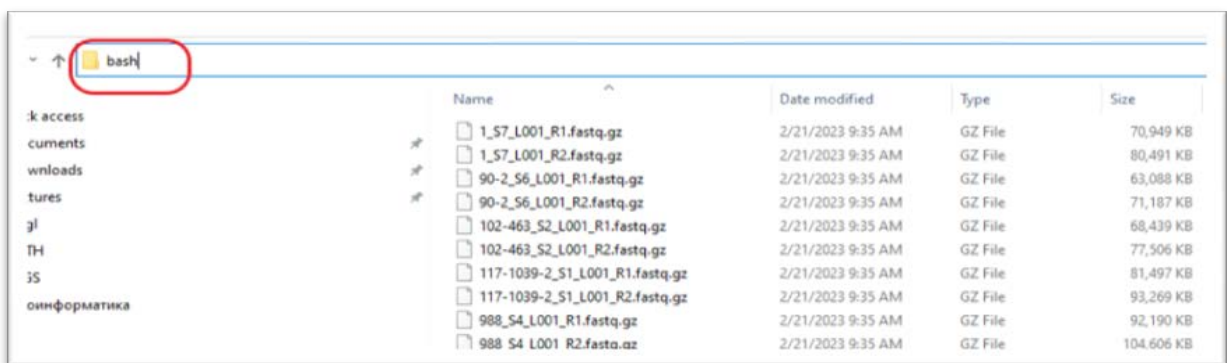


Рис. 2. Вписана команда bash в адресний рядок.

5. Натиснути Enter після чого відкриється Linux і з'явиться командна оболонка інструменту MTBseq і командний рядок цього інструменту (рис. 3).

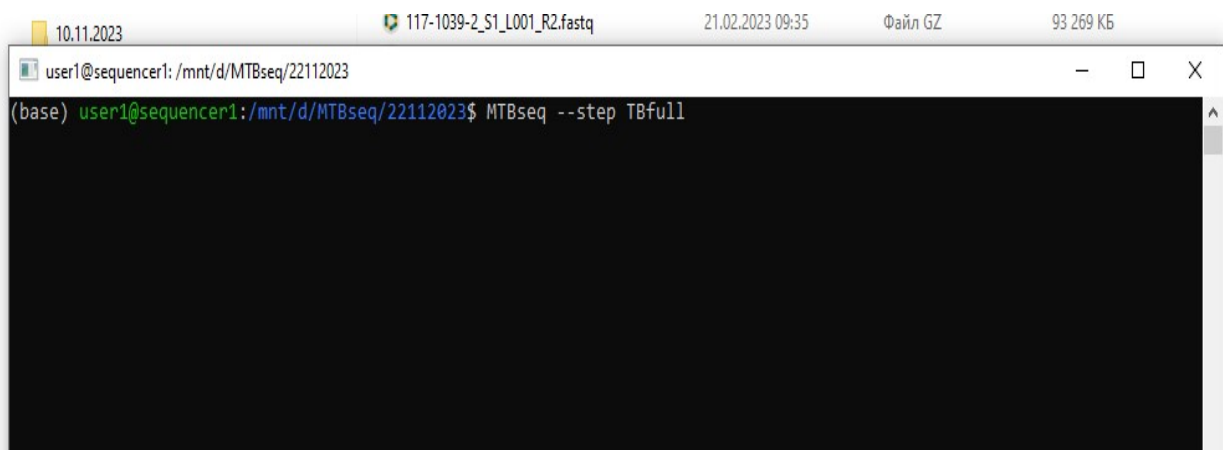


Рис. 3. Командна оболонка інструменту MTBseq.

6. Щоб запустити повний робочий інструмент, стрілками ввєрх вниз обрати команду “MTBseq – step TVfull” для запуску аналізу файлів конкретної створеної папки результатів. Це призведе до автоматичного запуску усіх компонентів інструменту MTBseq та виконання всього аналізу для досліджуваних зразків, які були в папці, що нами створена. Будь-який процес, передбачений інструментом MTBseq (див. п. 3) запускається введенням в командний рядок певних команд.

7. У створеній папці (D:/MTBseq/дата секвенування), яка містить FASTQ файли, що підлягають аналізу, інструмент створює низку додаткових папок, де будуть збережені оброблені дані, а також текстовий документ, що міститиме звіт про аналіз даних (рис. 4). Текстовий файл журналу та отримані результати аналізу автоматично з'являться у каталозі папки, з якої був запуснений інструмент (п. 1–4).

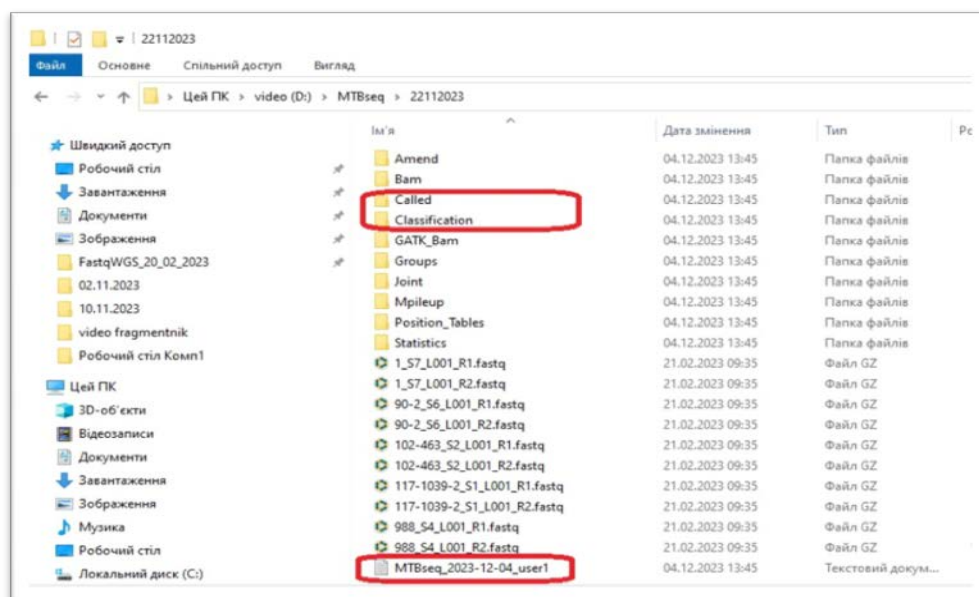


Рис 4. Каталог автоматично створених папок та текстовий документ про результати аналізу даних секвенування.

За результатами аналізу даних інформація про стійкість штамів до протитуберкульозних препаратів буде сформована у створеному каталозі у папці Called (D:/MTBseq/дата секвенування/Called), про належність штамів до певних ліній – у папці Classification (D:/MTBseq/дата секвенування/Classification), а про загальні показники якості даних – у папці Statistic

(D:/MTBseq/дата секвенування /Statistic). Уся оброблена інформація представлена у вигляді Excel таблиць.

## 6.2 Результати аналізу даних

° Для перевірки якості даних відкрийте папку «Statistic» (рис.5).

В ній знаходиться файл “Mapping\_and\_Variant\_Statistics”, який містить основні показники якості (табл. 1):

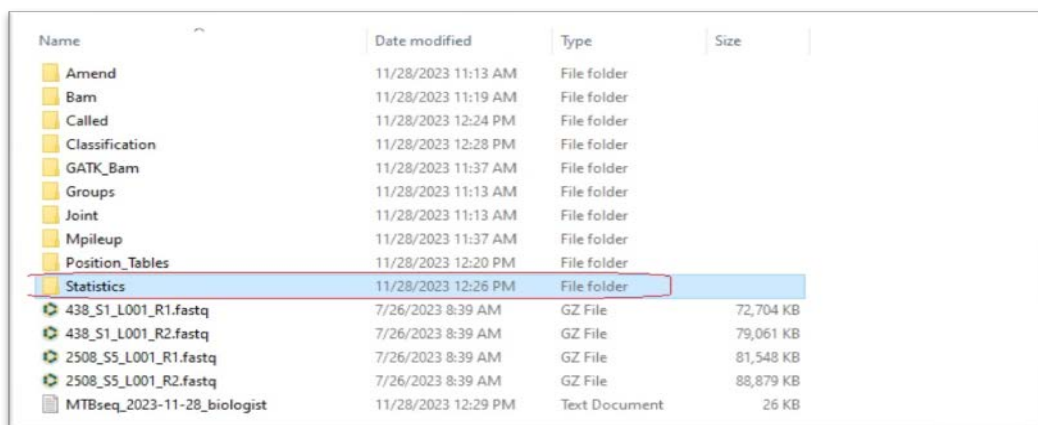


Рис. 5. Робоча папка Statistic з обробленими результатами.

Таблиця 1 – Показники якості даних

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	Date	SampleID	Total Reads	Mapped Reads	% Mapped Reads	Genome Size	Genome GC	Total Bases	GC-Content	Coverage mean
2	'2023-11-28	'2508	'1448726	'1394311	'96.24	'4411532	'65.61	'4375906	'65.61	'41.09
3	'2023-11-28	'438	'1330199	'1288701	'96.88	'4411532	'65.61	'4379475	'65.61	'36.42
4										

**Data** – дата виконання аналізу,  
**SampleID** – номер зразка,  
**Total Reads** – кількість секвенованих зчитувань,  
**Mapped Reads** – картовані зчитування  
**%Mapped Reads** – відсоток зчитувань картованих у порівнянні до референсного геному (оптимальне значення  $\geq 95,0$  %; допустиме  $\geq 80,0$  %, при менших показниках потребує перестановки секвенування),  
**Genome Size** – розмір референсного геному,  
**Genome GC** – вміст пар GC референсного геному,  
**Total Bases** – розмір референсного геному охопленого зчитуваннями (значення повинно бути якомога ближче до референсного Genome Size),  
**GC Content** – вміст GC референсного геному, що охоплений зчитуваннями досліджуваного зразка (значення повинно бути якомога ближче до референсного),  
**Coverage mean** – середня глибина покриття (оптимально – 50; допустимо 30-40;  $\leq 30$  потребує перестановки секвенування ).

• **Належність штаму до виду та генопиту**

В папці «Classification» у файлі «Strain\_Classification» в Excel таблиці зібрана інформація про родовід для кожного штаму за проведеним аналізом даних. У табл. на рис. 6 наведені основні характеристики досліджених штамів.

1	2	3	4	5	6	7	8	9
Date	SampleID	Homolka species	Coll lineage	Coll lineage_name	Coll quality	Beijing lineage		
'2023-04-26	'1017	'M. tuberculosis	'2.2.1	'Beijing	'good	'Central Asia outbreak		
'2023-04-26	'102-463	'M. tuberculosis	'2.2.1	'Beijing	'bad	'Central Asia		
'2023-04-26	'1070	'M. tuberculosis	'2.2.1	'Beijing	'good	'Central Asia outbreak		
'2023-04-26	'117-1039	'M. tuberculosis	'4.2.1	'Ural	'good	'unknown		
'2023-04-26	'1	'M. tuberculosis	'2.2.1	'Beijing	'good	'Central Asia		
'2023-04-26	'2213-3	'M. tuberculosis	'2.2.1	'Beijing	'good	'Central Asia		
'2023-04-26	'90-2	'M. tuberculosis	'2.2.1	'Beijing	'good	'Europe/Russian W148 Outbreak		
'2023-04-26	'988	'M. tuberculosis	'2.2.1	'Beijing	'good	'Europe/Russian W148 Outbreak		

Рис. 6. Основні характеристики досліджених штамів.

**Data** – дата виконання аналізу,  
**SampleID** – номер зразка,  
**Species** – вид мікроорганізму,  
**Linage** – лінія (цифрова назва),  
**Lineage name** – назва лінії,  
**Quality** – якість (good – для показників покриття  $\geq 10$  та частоти  $\geq 75$  %, bad- для менших показників покриття та частоти),  
**Beijing lineage** – сублінія.

• **Визначення мутацій, асоційованих з антибіотикорезистентністю**

Результати, пов'язані з мутаціями, для кожного з протестованих штамів знаходяться в папці «Called», в окремому для кожного зразка файлі: «№зразка.gatk\_position\_variants\_cf4\_cr4\_fr75\_ph4\_outmode000». Інформація викладена в Excel таблицях (рис. 7).

1	#Pos	Inside Ref	Type	Allel	CovFor	CovRev	Qual20	Freq	Cov	Subst	Gene	GeneNam	Product	Resista_X	Phyl	InterestingRegion
360	761155	0 C	SNP	T	21	21	42	100	42	Ser450Leu (tcg/tTg)	Rv0667	rpoB	DNA-direc rifampicin			rifampicin (RMP)
370	781687	0 A	SNP	G	36	27	60	100	63	Lys43Arg (aag/aGg)	Rv0682	rpsL	30S ribosc streptom			streptomycin (SM)
910	2155168	0 C	SNP	G	21	19	39	100	40	Ser315Thr (agc/aCc)	Rv1908c	katG	catalase-p isoniazid (			isoniazid (INH)
970	2288820	0 T	SNP	G	21	22	40	100	43	Gln141Pro (cag/cCg)	Rv2043c	pncA	pyrazinamr pyrazinamr			pyrazinamide (PZA)
1730	4247429	0 A	SNP	G	13	19	32	100	32	Met306Val (atg/Gtg)	Rv3795	embB	arabinosy ethambut			ethambutol (EMB)

Рис.7. Мутації асоційовані з антибіотикорезистентністю.

В таблиці приведені основні значення:

- Pos** – позиція в референсному геномі,
- Ref** – нуклеотид, представлений у референсному геномі,
- Type** – тип виявленого варіанту змін (наприклад, SNP – Single Nucleotide Polymorphism – однонуклеотидний поліморфізм),
- Allel** – виявлена заміна нуклеотиду для відповідного зразка в цій позиції,
- Qual20** – кількість зчитувань для виявленого алеля з показником phred, принаймні 20,
- Freq** – частота виявленого алеля,
- Cov** – загальна глибина покриття в цій позиції,
- Subst** – інформація про амінокислотну заміну,
- Gene** – ідентифікатор гену, як наведено в анотації до референсного геному,
- GeneName** – назва гену як наведено в анотації до референсного геному,
- ResistenteSNP** – препарат, до якого визначено резистентність за відомими асоціаціями.

## 6.3 Документація

### Видача результату

Після перегляду робочих таблиць з обробленими проаналізованими даними слід заповнити форму для видачі результату (Додаток 1).

Додаток 1

Результати повногеномного секвенування  
за аналізом даних MTBseq для визначення генотипу та виявлення мутацій у генах,  
асоційованих з резистентністю до протитуберкульозних препаратів

1. Штам № \_\_\_\_\_
2. Назва виду \_\_\_\_\_
3. Генотип (лінія/ сублінія) \_\_\_\_\_
4. Виявлені мутації \_\_\_\_\_

Позиція	Заміна нуклеотидів	Зміна амінокислот	Ген	Асоціація з резистентністю

Дата видачі результату \_\_\_\_\_

Керівник лабораторії \_\_\_\_\_

ПІБ

Підпис

Виконавець \_\_\_\_\_

ПІБ

Підпис

### Супутні документи

- GitHub: [https://github.com/ngs-fzb/MTBseq\\_source](https://github.com/ngs-fzb/MTBseq_source).
- Kohl TA, Utpatel C, Schleusener V, De Filippo MR, Beckert P, Cirillo DM, Niemann S. MTBseq: a comprehensive pipeline for whole genome sequence analysis of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. PeerJ. 2018 Nov 13;6:e5895. doi: 10.7717/peerj.5895. PMID: 30479891; PMCID: PMC6238766.
- [https://github.com/ngs-fzb/MTBseq\\_source/blob/master/MANUAL.md](https://github.com/ngs-fzb/MTBseq_source/blob/master/MANUAL.md)

## ЗАКЛЮЧЕННЯ

Сучасний стан бактеріологічної діагностики туберкульозу характеризується активним впровадженням в практичну діяльність високотехнологічних методів разом з існуючими класичними. Кожен з методів має свою діагностичну нішу, але незрівнянно більший ефект досягається при впровадженні «діагностичного ланцюжка», або алгоритму, що полягає в поєднанні класичних фенотипічних методів з прискореними методами культуральної діагностики та молекулярно-генетичними технологіями. Саме такий підхід є раціональним і ефективним та всебічним при бактеріологічній верифікації діагнозу «туберкульоз».

Чи доцільно впроваджувати на сучасному етапі в діагностику туберкульозу дорогі технології секвенування? На нашу думку, є доцільним. Лише кілька років тому метод полімеразно-ланцюгової реакції (ПЛР) представлявся дорогим і сприймався скептично, поки не була напрацьована достатня доказова база. Поступове здешевлення ПЛР-технологій зробило ПЛР-діагностику туберкульозу, зокрема з лікарською стійкістю, однією з найпоширеніших в Україні.

Також треба віднестись і до технологій NGS і вже сьогодні впроваджувати їх у діагностичну практику на базі мікробіологічних лабораторій великих фтизіатричних центрів. І тоді в міру розвитку та вдосконалення технології NGS у перспективі набудуть широкого поширення. Швидке, протягом кількох днів, отримання в одному тесті повної інформації про збудник сприятиме вдосконаленню діагностики туберкульозу і, як наслідок, підвищенню ефективності терапії, а також поглибленню знань про біологічні властивості збудника туберкульозу, що виведе заходи щодо контролю за туберкульозом на новий рівень.