



**Набор адаптеров
для подготовки NGS библиотек
"ADP Display"**

Инструкция по применению

Содержание

Содержание	1
Введение	2
Варианты исполнения.....	2
1 Назначение набора.....	2
2 Характеристика набора	2
2.1 Состав набора адаптеров.....	2
2.2 Количество реакций	3
2.3 Принцип действия набора	3
3 Меры предосторожности.....	6
4 Оборудование и материалы	7
4.1 Оборудование, необходимое для работы с набором реагентов	7
4.2 Материалы, необходимые для работы с набором реагентов	8
5 Материал для лигирования адаптеров	8
6 Подготовка адаптеров к работе.....	8
6.1 Выбор адаптеров.....	8
6.2 Расчет количества адаптеров	9
6.3 Подготовка адаптеров	10
7 Требования к транспортированию и хранению	10
7.1 Транспортирование	10
7.2 Хранение	11
8 Указания по применению.....	11
9 Требования к утилизации	11
10 Гарантийные обязательства	12
11 Маркировка.....	13

Введение

В медицинской генетике и научно-исследовательской практике широко применяется технология массового параллельного секвенирования (NGS). Исследование образцов двуцепочечной ДНК (дцДНК) методами NGS требует подготовки библиотек – совокупности фрагментов образца ДНК, модифицированных соответствующим образом. В дальнейшем библиотеки загружаются в секвенатор, что позволяет получить массив данных с информацией о последовательности различных фрагментов библиотеки.

Варианты исполнения

Набор адаптеров для подготовки NGS-библиотек "ADP Display" (далее по тексту – набор адаптеров) представлен в трех вариантах исполнения:

- 1) Набор из 8 адаптеров "ADP Display (8)";
- 2) Набор из 24 адаптеров "ADP Display (24)";
- 3) Набор из 96 адаптеров "ADP Display (96)".

1 Назначение набора

Набор адаптеров предназначен для приготовления библиотек ДНК для дальнейшего секвенирования методом NGS на платформах Illumina. Использование адаптеров обеспечивает связывание исследуемых фрагментов дцДНК с поверхностью проточной кюветы секвенатора и их идентификацию. Лигирование адаптеров, содержащих уникальные последовательности (индексы) к фрагментам исследуемой дцДНК позволяет однозначно маркировать исследуемые образцы и проводить секвенирование нескольких образцов в одной проточной кювете.

Набор адаптеров предназначен только для исследовательских целей (RUO).

2 Характеристика набора

2.1 Состав набора адаптеров

В состав набора входят адаптеры с индексами (Y_i), вода для ПЦР.

Набор "ADP Display (8)":

- Y_i (i изменяется от 1 до 8),
- Вода для ПЦР.

Набор "ADP Display (24)".

- Y_i (i изменяется от 1 до 24),
- Вода для ПЦР.

Набор "ADP Display (96)":

- Y_i (i изменяется от 1 до 96),
- Вода для ПЦР.

Каждый адаптер разведен в воде для ПЦР в концентрации 14 мкМ.

Состав набора и объем реагентов приведены в таблице 1.

Таблица 1. Состав набора и объем реагентов

Набор	Наименование реагента	Значение i	Пробирка, шт	Номинальный объем, мкл
Набор из 8 адаптеров	Y_i	от 1 до 8	8	44
	Вода для ПЦР	–	1	900
Набор из 24 адаптеров	Y_i	от 1 до 24	24	44
	Вода для ПЦР	–	3	900
Набор из 96 адаптеров	Y_i	от 1 до 96	96	44
	Вода для ПЦР	–	7	1550

2.2 Количество реакций

Набор из 8 адаптеров "ADP Display (8)" позволяет приготовить 4 библиотеки на 8 образцов, всего 32 библиотеки.

Набор из 24 адаптеров "ADP Display (24)" позволяет приготовить 4 библиотеки на 24 образца, всего 96 библиотек.

Набор из 96 адаптеров "ADP Display (96)" позволяет приготовить 4 библиотеки на 96 образцов, всего 384 библиотеки.

2.3 Принцип действия набора

Y -адаптер состоит из двух нуклеотидных последовательностей, комплементарных на участке из 12 нуклеотидов. Каждая нуклеотидная последовательность содержит сайт связывания с поверхностью проточной кюветы секвенатора (P5 или P7), уникальный индекс ($i5$ или $i7$) и участок посадки праймера для секвенирования. Последовательности адаптеров приведены в таблице 2.

Таблица 2. Последовательности адаптеров

Название структуры	Последовательность, 5' – 3'
P7 часть адаптера	GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCAC [Index i7] ATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG
P5 часть адаптера	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC [Index i5] ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT

P5 часть адаптера содержит 3'-dT, что позволяет проводить лигирование адаптеров с 3'-dA-фрагментами исследуемой дцДНК. Подобный тип лигирования адаптеров называется Т–А лигированием.

Схема лигирования адаптеров к исследуемым фрагментам дцДНК представлена на рисунке 1.

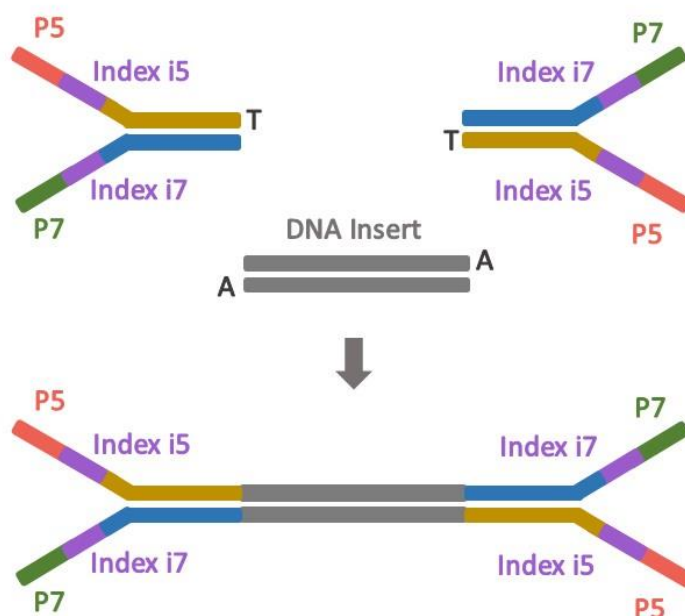


Рис. 1. Принцип лигирования адаптеров к исследуемым фрагментам дцДНК. P5 и P7 – сайты связывания с поверхностью проточной кюветы.

Каждый Y-адаптер содержит два уникальных индекса, что позволяет однозначно маркировать образцы и проводить секвенирование нескольких образцов в одной проточной кювете. Последовательности индексов приведены в таблице 3.

Таблица 3. Последовательности индексов

Название адаптера	Индекс i7, 5' – 3'	Индекс i5, 5' – 3'	Название адаптера	Индекс i7, 5' – 3'	Индекс i5, 5' – 3'
Y ₁	CCGCGGTT	AGCGCTAG	Y ₄₉	ATATCTCG	ATCTTAGT
Y ₂	TTATAACC	GATATCGA	Y ₅₀	GCGCTCTA	GCTCCGAC
Y ₃	GGACTTGG	CGCAGACG	Y ₅₁	AACAGGTT	ATACCAAG
Y ₄	AAGTCCAA	TATGAGTA	Y ₅₂	GGTGAACC	GCGTTGGA
Y ₅	ATCCACTG	AGGTGCGT	Y ₅₃	CAACAATG	CTTCACGG
Y ₆	GCTTGTC A	GAACATAC	Y ₅₄	TGGTGGCA	TCCTGTAA
Y ₇	CAAGCTAG	ACATAGCG	Y ₅₅	GTTCGCCG	GCTCATTG
Y ₈	TGGATCGA	GTGCGATA	Y ₅₆	CACGAGCG	ATCTGCCA
Y ₉	AGTTCAGG	CCAACAGA	Y ₅₇	TGCGGCGT	CCTCGGTA
Y ₁₀	GACCTGAA	TTGGTGAG	Y ₅₈	CATAATAC	TTCTAACG
Y ₁₁	TCTCTACT	CGCGGTTC	Y ₅₉	GATCTATC	ATGAGGCT
Y ₁₂	CTCTCGTC	TATAACCT	Y ₆₀	AGCTCGCT	GCAGAATC
Y ₁₃	CCAAGTCT	AAGGATGA	Y ₆₁	CGGAACTG	CACTACGA
Y ₁₄	TTGGACTC	GGAAGCAG	Y ₆₂	TAAGGTCA	TGTCGTAG
Y ₁₅	CAGTAGGC	TGACGAAT	Y ₆₃	TTGCCTAG	ACCACTTA
Y ₁₆	TGACGAAT	CAGTAGGC	Y ₆₄	CCATTCGA	GTTGTCCG
Y ₁₇	TAATACAG	ATATTCAC	Y ₆₅	ACACTAAG	ATCCATAT
Y ₁₈	CGGCGTGA	GCGCCTGT	Y ₆₆	GTGTCCGA	GCTTGCGC
Y ₁₉	ATGTAAGT	ACTCTATG	Y ₆₇	TTCCTGTT	AGTATCTT
Y ₂₀	GCACGGAC	GTCTCGCA	Y ₆₈	CCTTCACC	GACGCTCC
Y ₂₁	GGTACCTT	AAGACGTC	Y ₆₉	GCCACAGG	CATGCCAT
Y ₂₂	AACGTTCC	GGAGTACT	Y ₇₀	ATTGTGAA	TGCATTGC
Y ₂₃	GCAGAATT	ACCGGCCA	Y ₇₁	ACTCGTGT	ATTGGAAC
Y ₂₄	ATGAGGCC	GTTAATTG	Y ₇₂	GTCTACAC	GCCAAGGT
Y ₂₅	ACTAAGAT	AACCGCGG	Y ₇₃	CAATTAAC	CGAGATAT
Y ₂₆	GTCGGAGC	GGTTATAA	Y ₇₄	TGGCCGGT	TAGAGCGC
Y ₂₇	CTTGGTAT	CCAAGTCC	Y ₇₅	AGTACTCC	AACCTGTT
Y ₂₈	TCCAACGC	TTGGACTT	Y ₇₆	GACGTCTT	GGTTCACC
Y ₂₉	CCGTGAAG	CAGTGGAT	Y ₇₇	TGCGAGAC	CATTGTTG
Y ₃₀	TTACAGGA	TGACAAGC	Y ₇₈	CATAGAGT	TGCCACCA
Y ₃₁	GGCATTCT	CTAGCTTG	Y ₇₉	ACAGGCGC	CTCTGCCT
Y ₃₂	AATGCCTC	TCGATCCA	Y ₈₀	GTGAATAT	TCTCATTC
Y ₃₃	TACCGAGG	CCTGAACT	Y ₈₁	AACTGTAG	ACGCCGCA
Y ₃₄	CGTTAGAA	TTCAGGTC	Y ₈₂	GGTCACGA	GTATTATG
Y ₃₅	AGCCTCAT	AGTAGAGA	Y ₈₃	CTGCTTCC	GATAGATC

Y ₃₆	GATTCTGC	GACGAGAG	Y ₈₄	TCATCCTT	AGCGAGCT
Y ₃₇	TCGTAGTG	AGACTTGG	Y ₈₅	AGGTTATA	CAGTTCCG
Y ₃₈	CTACGACA	GAGTCCAA	Y ₈₆	GAACCGCG	TGACCTTA
Y ₃₉	TAAGTGGT	CTTAAGCC	Y ₈₇	CTCACCAA	CTAGGCAA
Y ₄₀	CGGACAAC	TCCGGATT	Y ₈₈	TCTGTTGG	TCGAATGG
Y ₄₁	ATATGGAT	CTGTATTA	Y ₈₉	TATCGCAC	CTTAGTGT
Y ₄₂	GCGCAAGC	TCACGCCG	Y ₉₀	CGCTATGT	TCCGACAC
Y ₄₃	AAGATACT	ACTTACAT	Y ₉₁	GTATGTTC	AACAGGAA
Y ₄₄	GGAGCGTC	GTCCGTGC	Y ₉₂	ACGCACCT	GGTGAAGG
Y ₄₅	ATGGCATG	AAGGTACC	Y ₉₃	ТАСТСАТА	ССТГТГГС
Y ₄₆	GCAATGCA	GGAACGTT	Y ₉₄	CGTCTGCG	TTCACAAT
Y ₄₇	GTTCCAAT	AATTCTGC	Y ₉₅	TCGATATC	ACACGAGT
Y ₄₈	ACCTTGGC	GGCCTCAT	Y ₉₆	CTAGCGCT	GTGTAGAC

3 Меры предосторожности

- 3.1 Допускать к работе с набором реагентов только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в ПЦР-лаборатории.
- 3.2 Применять набор реагентов строго по назначению, согласно настоящей инструкции.
- 3.3 Работу следует проводить в ПЦР-боксе биобезопасности II класса защиты.
- 3.4 Во избежание риска контаминации проводить выделение образцов ДНК и постановку ПЦР в отдельных помещениях (зонах). Не возвращать образцы, реагенты и оборудование в зону, в которой была проведена предыдущая стадия.
- 3.5 При работе с набором реагентов использовать лабораторную одежду и одноразовые медицинские перчатки без талька. Тщательно вымыть руки по окончании работы.
- 3.6 Каждое рабочее место должно быть снабжено собственным набором дозаторов переменного объема, необходимыми вспомогательными материалами и оборудованием. Запрещается их перемещение между рабочими местами.
- 3.7 При постановке ПЦР использовать и менять после каждой операции одноразовые наконечники с фильтром для автоматических дозаторов. Использованные наконечники и пробирки сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство для обеззараживания медицинских отходов.

3.8 Избегать контакта с кожей, глазами и слизистыми оболочками. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.

3.9 После окончания работ для дезинфекции и предотвращения контаминации все рабочие поверхности и оборудование следует подвергнуть действию бактерицидных УФ ламп в течение 1 часа. Провести обработку рабочих поверхностей оборудования дезинфицирующими средствами.

3.10 Не использовать компоненты наборов реагентов из разных серий.

3.11 Не использовать набор реагентов по истечении срока годности, при нарушении условий транспортировки или хранения.

П р и м е ч а н и е – Набор реагентов не содержит веществ в концентрациях, обладающих канцерогенным, мутагенным действием, а также влияющих на репродуктивную функцию человека. При использовании по назначению и соблюдении мер предосторожности является безопасным.

3.12 Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, биологический материал и упаковку подвергать обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией согласно СанПин 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами». **ВНИМАНИЕ!** При удалении отходов после амплификации (пробирок, содержащих продукты ПЦР) недопустимо открывание пробирок и разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, реагентов и оборудования.

4 Оборудование и материалы

4.1 Оборудование, необходимое для работы с набором реагентов

- Автоматические дозаторы одноканальные переменного объема, разных объемов (например, DiscoveryComfort, Corning HTL SA, Польша или аналогичные).
- Мини-центрифуга-вортекс (например, «Микроспин» FV-2400 SIA «Biosan», Латвия или аналогичный).
- ПЦР-бокс 2-го класса биологической защиты для работы с ДНК (например, БАВ-ПЦР-Ламинар-С, ЗАО «Ламинарные системы», Россия или аналогичный).

- Термостол холодный (например, Микротермостат М-210, ООО «БИС-Н», Россия или аналогичный).
- Холодильник с морозильной камерой от минус 18 до минус 25°C (например, ATLANT XM-6023-031, ЗАО «АТЛАНТ», РБ или аналогичный).

4.2 Материалы, необходимые для работы с набором реагентов

- Контейнер одноразовый, пластиковый для сброса отходов (например, «ЕК-01», ООО «КМ-ПРОЕКТ», Россия или аналогичный).
- Пробирки микроцентрифужные градуированные, объемом 0,2; 0,5; 1,5 мл (Axugen Inc., США или Bio-Rad Laboratories Inc., США).
- Наконечники для дозаторов универсальные с фильтром, разных объемов (например, Axugen Inc., США или аналогичные).
- Перчатки медицинские одноразовые неопудренные нитриловые или латексные (например, TG MEDICAL Sdn. Bhd., Малайзия или аналогичные).
- Штативы для пробирок разных объемов (например, Axugen Inc., США или аналогичные).

5 Материал для лигирования адаптеров

Адаптеры лигируют к фрагментам дцДНК (в том числе геномной ДНК человека), продуктам таргетной амплификации ДНК, разведенным в воде или буфере (10 мМ Трис-НСl, рН 8.0 – 8.5). Фрагменты дцДНК должны быть подготовлены специальным образом и иметь однонитевой выступ 3'-dA.

Количество ДНК, которое может быть использовано в данном наборе, составляет от 10 до 100 нг.

Для приготовления библиотек рекомендуется использовать набор LIG Display (ООО «БиоЛинк», Россия). Также возможно использование наборов в основе которых лежит принцип Т-А лигирования от других производителей.

6 Подготовка адаптеров к работе

6.1 Выбор адаптеров

Если планируется загрузка нескольких библиотек для секвенирования в одну проточную кювету, необходимо выбрать адаптеры из представленных в таблице 4, следуя следующим рекомендациям: следует смешивать адаптеры,

расположенные в одной колонке таблицы; не рекомендуется смешивать адаптеры, расположенные в одном ряду таблицы.

Выбрать адаптеры для всех исследуемых образцов, используя таблицу 4.

Таблица 4. Адаптеры

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Y ₁	Y ₉	Y ₁₇	Y ₂₅	Y ₃₃	Y ₄₁	Y ₄₉	Y ₅₇	Y ₆₅	Y ₇₃	Y ₈₁	Y ₈₉
B	Y ₂	Y ₁₀	Y ₁₈	Y ₂₆	Y ₃₄	Y ₄₂	Y ₅₀	Y ₅₈	Y ₆₆	Y ₇₄	Y ₈₂	Y ₉₀
C	Y ₃	Y ₁₁	Y ₁₉	Y ₂₇	Y ₃₅	Y ₄₃	Y ₅₁	Y ₅₉	Y ₆₇	Y ₇₅	Y ₈₃	Y ₉₁
D	Y ₄	Y ₁₂	Y ₂₀	Y ₂₈	Y ₃₆	Y ₄₄	Y ₅₂	Y ₆₀	Y ₆₈	Y ₇₆	Y ₈₄	Y ₉₂
E	Y ₅	Y ₁₃	Y ₂₁	Y ₂₉	Y ₃₇	Y ₄₅	Y ₅₃	Y ₆₁	Y ₆₉	Y ₇₇	Y ₈₅	Y ₉₃
F	Y ₆	Y ₁₄	Y ₂₂	Y ₃₀	Y ₃₈	Y ₄₆	Y ₅₄	Y ₆₂	Y ₇₀	Y ₇₈	Y ₈₆	Y ₉₄
G	Y ₇	Y ₁₅	Y ₂₃	Y ₃₁	Y ₃₉	Y ₄₇	Y ₅₅	Y ₆₃	Y ₇₁	Y ₇₉	Y ₈₇	Y ₉₅
H	Y ₈	Y ₁₆	Y ₂₄	Y ₃₂	Y ₄₀	Y ₄₈	Y ₅₆	Y ₆₄	Y ₇₂	Y ₈₀	Y ₈₈	Y ₉₆

6.2 Расчет количества адаптеров

Расчет количества адаптеров приведен для варианта приготовления библиотеки с использованием 100 нг дцДНК исследуемого образца и набора реагентов LIB Display (ООО «БиоЛинк», Россия). Общий объем всех реагентов в одной реакции лигирования постоянен и составляет 60 мкл, объем образца, вносимого в реакцию, составляет 20 мкл. Диапазон длин фрагментов дцДНК выбран 150–250 п.н., среднее значение длины фрагментов принимается как среднее арифметическое крайних значений диапазона и составляет 200 п.н.

При использовании данного набора адаптеров оптимальное соотношение количества адаптеров к количеству фрагментов составляет 200:1. Расчетное количество адаптеров на одну реакцию лигирования представлено в таблице 5.

Таблица 5. Объем реагентов на одну реакцию

Адаптер	Значение i	Концентрация дцДНК, нг/мкл	Объем образца, мкл	Концентрация адаптера, мкМ	Объем адаптера, мкл
Y _i	от 1 до 96	5	20	14	11

Важно соблюдать оптимальное соотношение количества фрагментов исследуемой дцДНК и адаптеров. В случае использования фрагментов дцДНК большей длины, пропорционально уменьшается их количество в образце и соответственно, необходимо уменьшать количество адаптеров, участвующих в реакции лигирования. Для сохранения общего объема реагентов в реакции

лигирования необходимо развести исходный раствор адаптеров водой для ПЦР. Соотношение значения концентрации адаптеров и средней длины фрагментов дцДНК представлено в таблице 6.

Таблица 6. Концентрация адаптеров

Объем образца, мкл	Концентрация дцДНК, нг/мкл	Диапазон длин фрагментов дцДНК, п.н.	Средняя длина фрагментов дцДНК, п.н.	Объем адаптера, мкл	Концентрация адаптера, мкМ
20	5	150–250	200	11	14
20	5	200–350	275	11	10,2
20	5	275–475	375	11	7,5
20	5	350–600	475	11	5,9

Если в реакции лигирования используется меньшее количество дцДНК, необходимо развести исходный раствор адаптеров водой для ПЦР для сохранения соотношения количества адаптеров и фрагментов дцДНК.

Рассчитать необходимое количество каждого выбранного адаптера в соответствии с количеством дцДНК в образце, средней длиной фрагментов дцДНК.

6.3 Подготовка адаптеров

Разморозить выбранные адаптеры при комнатной температуре. **ВАЖНО!** Не следует размораживать адаптеры при температуре выше комнатной.

Перемешать на вортексе и кратко центрифугировать в течение 1–2 сек при 1000 об/мин.

Приготовить рассчитанные количества адаптеров в соответствии с количеством образцов дцДНК и количеством дцДНК в образцах. Разместить пробирки с адаптерами на термостол, предварительно охлажденном до 4°C.

ВАЖНО! Оставшиеся адаптеры сразу убрать на хранение при минус 18°C. Не хранить разведенные растворы адаптеров. Рекомендуется использовать в реакции свежеприготовленные растворы адаптеров.

Дальнейшее лигирование адаптеров проводить в соответствии с инструкцией к набору реагентов LIB Display (ООО «БиоЛинк», Россия) или другого производителя.

7 Требования к транспортированию и хранению

7.1 Транспортирование

Транспортирование набора адаптеров осуществляют всеми видами крытого транспорта при температуре не выше минус 18°C.

Наборы адаптеров, транспортированные с нарушением температурного режима, применению не подлежат.

7.2 Хранение

Набор адаптеров следует хранить в холодильнике или морозильной камере при температуре от минус 18 до минус 22°C в течение всего срока годности набора.

Наборы адаптеров, хранившиеся с нарушением регламентированного режима, применению не подлежат.

8 Указания по применению

8.1 Набор адаптеров должен применяться согласно инструкции по применению.

8.2 В процессе постановки эксперимента адаптеры рекомендуется хранить на термостоле с температурой 4°C или в штативе с охлаждением (на льду).

8.3 Следует избегать излишних (более пяти) циклов замораживания-размораживания адаптеров. Если набор адаптеров предполагается использовать на длительном промежутке времени с постановкой небольшого количества реакций, рекомендуется предварительно разделить раствор адаптеров на аликвоты.

8.4 Не хранить разведенные растворы адаптеров. Рекомендуется использовать в эксперименте свежеприготовленные растворы адаптеров.

8.5 Наборы адаптеров с истекшим сроком годности применению не подлежат.

9 Требования к утилизации

9.1 При использовании набора адаптеров образуются отходы классов А и Б, которые классифицируются и утилизируются в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10.

9.2 Наборы адаптеров, пришедшие в непригодность, в том числе в связи с истечением срока годности, и неиспользованные адаптеры относятся к классу Б и подлежат утилизации в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 и МУ 1.3.2569-09.

9.3 Упаковка набора адаптеров (коробки картонные) после использования по назначению, относится к отходам класса А и утилизируется с бытовыми отходами.

10 Гарантийные обязательства

10.1 Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие основных параметров и характеристик набора адаптеров требованиям нормативной и технической документации в течении указанного срока годности при соблюдении условий транспортирования, хранения и эксплуатации, установленных техническими условиями.

10.2 Срок годности набора адаптеров – 12 месяцев со дня выпуска при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и эксплуатации.

10.3 Рекламации по вопросам качества набора адаптеров "ADP Display" следует направлять в ООО «БиоЛинк» по адресу: 630090 г. Новосибирск, ул. Николаева, 13. Тел: +7 (383)209-32-40, e-mail: info@biolinklab.ru

11 Маркировка

Маркировка потребительской упаковки содержит следующие графические СИМВОЛЫ:

	Содержимого достаточно для проведения указанного количества реакций		Номер по каталогу
	Температурный диапазон (условия хранения и транспортирования)		Номер серии
	Обратитесь к инструкции по применению		Дата изготовления (месяц, год)
	Только для исследовательских целей		Использовать до (месяц, год)
			Изготовитель

Производство: ООО «БиоЛинк»

Адрес: 630090, г. Новосибирск, ул. Николаева, д. 13

Телефон: (383) 209-32-40

E-mail: info@biolinklab.ru

Веб-сайт: biolinklab.ru