

Supplement 1 / Приложение 1

Пошаговый протокол

Протокол выделения ДНК

1. Взвесьте ≤ 20 мг лиофилизированной ткани и поместите в пробирку размером 2 мл два стеклянных шарика и растительный материал, далее заморозьте листья с использованием жидкого азота и с помощью гомогенизатора разбейте образцы.
2. После измельчения гомогената сначала добавляйте 400 мкл буфера AP1, а затем 4 мкл РНКазы А и перемешивайте на вортексе. Затем инкубируйте 10 мин при 65°C. Во время инкубации переверните пробирку 2–3 раза.
3. Добавьте 130 мкл буфера Р3, пипетируйте и инкубируйте на льду 5 минут, а затем центрифугируйте лизат в течение 5 минут при 20 000 x g (14 000 об/мин). Далее перенесите лизат в спин-колонку QIAshredder, помещенную в пробирку для сбора, затем центрифугируйте в течение 2 минут при 20 000 x g (14 000 об/мин).
4. Аккуратно, не захватывая остатки гранул, перенесите в новую пробирку, добавляйте 1,5 объема буфера AW1 и перемешайте дозатором.
5. Далее перенесите 650 мкл смеси в спин-колонку DNeasy Mini, помещенную в 2-миллилитровую пробирку для сбора и центрифугируйте в течение 1 мин при ≥ 6000 x g (≥ 8000 об/мин). Вылейте жидкость и повторите этот шаг с оставшимся материалом.
6. Поместите спин-колонку в новую пробирку. Добавьте 500 мкл буфера AW2, центрифугируйте в течение 1 мин при ≥ 6000 x g и вылейте жидкость.
7. Далее повторите шаг 9 при оборотах центрифуги 20 000 x g (14 000 об/мин) в течение 2 минут.
8. Перенесите спин-колонку в новую микроцентрифужную пробирку на 1,5 мл или 2 мл. Добавьте 100 мкл буфера АЕ инкубируйте 5 мин при комнатной температуре (15–25°C). Центрифугируйте в течение 1 мин при ≥ 6000 x g. Отберите всю жидкость из пробирки, повторите шаг 8.

Протокол сборки библиотеки

Фрагментация и очистка

1. Используйте 1–4 мкг ДНК, растворенной в 150 мкл воды, свободной от нуклеаз, в микроцентрифужной пробирке объемом 1,5 мл. Убедитесь, что ДНК полностью растворилась и перемешалась.
2. Перенесите ДНК в верхнюю камеру g-TUBE (завинчивающейся крышкой вверх) и плотно закройте крышку.
3. Поместите g-TUBE в настольную центрифугу (закрутите крышку вверх) и вращайте пробирки со скоростью, необходимой для достижения желаемого размера фрагментов, в соответствии с инструкциями производителя. Проверьте g-TUBE, чтобы убедиться, что вся жидкость слита на дно.

4. Переверните g-TUBE, загрузите в ротор (завинтите крышку) и снова центрифугируйте с той же скоростью и продолжительностью. Проба будет собрана в завинчивающейся крышке.

5. Откройте g-TUBE (завинчивающейся крышкой вниз) и соберите всю жидкость.

6. Проверьте фрагменты ДНК с помощью биоанализатора Agilent 2100.

Восстановление (или ремонт) ДНК и подготовка концов (SQK-LSK109)

7. Подготовьте реагенты NEBNext FFPE DNA Repair Mix и NEBNext End Repair / dA-Tailing Module в соответствии с инструкциями производителя.

8. В пробирке для ПЦР объемом 0,2 мл смешайте следующее:

Реагент	Объем
Фрагментированная ДНК (1 мкг)	48 мкл
Буфер для восстановления ДНК NEBNext FFPE	3,5 мкл
Смесь для восстановления ДНК NEBNext FFPE	2 мкл
Конечный реакционный буфер Ultra II	3,5 мкл
Ферментная смесь для конечных препаратов Ultra II	3 мкл
Общий	60 мкл

Осторожно встряхните дно пробирки щелчками пальца, чтобы перемешать, и ненадолго покрутите, чтобы собрать всю жидкость на дно пробирки.

9. Инкубируйте 5 минут при 20°C и 5 минут при 65°C, используя термоциклер.

10. Ресуспендируйте шарики SPRI, встряхивая, для следующих шагов. Перед использованием шарики необходимо уравновесить до комнатной температуры в течение не менее 30 минут.

11. Перенесите фрагменты ДНК с готовыми концами в микроцентрифужную пробирку на 1,5 мл.

12. Добавьте 60 мкл ресуспендированных шариков и перемешайте переворачиванием.

13. Чтобы способствовать связыванию ДНК с шариками, инкубируйте смесь на ротаторе Hula Mixer, вращая в течение 5 мин при комнатной температуре.

14. Коротко вращайте и осаждайте шарики на магнитном штативе в течение 2–5 минут, пока жидкость не станет прозрачной и бесцветной, и слейте пипеткой супернатант.

15. Держите пробирку на магнитной стойке и промойте шарики, добавив 200 мкл свежеприготовленного 70-процентного этанола (в воде, свободной от нуклеаз). Используйте пипетку, чтобы удалить и выбросить 70-процентный этанол.

16. Повторите этап стирки.

17. Не вынимая пробирку из магнитного штатива, осторожно покрутите. Не задевая шарики, осторожно удалите остаточный этанол. Дайте шарикам высохнуть на воздухе в течение ~30 секунд и не пересушивайте их (избегайте больших трещин в шарике).

18. Добавьте 62 мкл воды, свободной от нуклеаз, к шарикам, переместите пробирку в ротатор Nula Mixer и инкубируйте при вращении в течение 2 мин при комнатной температуре.

19. Поместите пробирку обратно на магнитную стойку. Когда элюат станет прозрачным и бесцветным, перенесите 61 мкл и элюируйте в новую микроцентрифужную пробирку на 1,5 мл Eppendorf DNA LoBind.

20. Проверьте концентрацию библиотеки с помощью Qubit. Концентрация должна составлять > 700 ng.

Лигирование адаптера и очистка

21. Центрифугируйте Adapter Mix (AMX) and Quick T4 Ligase и поместите на лед.

22. Разморозьте Ligation Buffer (LNB) при комнатной температуре. Перемешайте пипетированием и положите на лед.

23. Разморозьте Elution Buffer (EB) при комнатной температуре. Перемешайте буфер на вортексе, центрифугируйте и поместите на лед.

24. Разморозьте Long Fragment Buffer (LFB) при комнатной температуре, перемешайте щелчком пальца по пробирке, затем покрутите пробирку на центрифуге и поместите на лед.

25. В пробирке Eppendorf DNA LoBind на 1,5 мл перемешайте в следующем порядке:

Реагент	Объем
Образец ДНК из вышеуказанного шага	60 мкл
Буфер для лигирования (LNB)	25 мкл
NEBNext Quick T4 ДНК-лигаза	10 мкл
Adapter Mix (AMX)	5 мкл
Общий	100 мкл

Осторожно встряхните дно пробирки щелчками пальца, чтобы перемешать, и ненадолго покрутите, чтобы собрать всю жидкость на дно пробирки.

26. Инкубируйте смесь для лигирования в течение 10 мин при комнатной температуре.

27. Ресуспендируйте шарики SPRI для этапов очистки.

28. Добавьте 40 мкл ресуспендированных шариков для связывания ДНК и перемешайте щелчками пальца по пробирке.

29. Инкубируйте пробирку с помощью ротатора Nula mixer в течение 5 мин при комнатной температуре.

30. Поместите пробирку на магнитный штатив. Когда жидкость станет прозрачной и бесцветной, удалите жидкость.
31. Добавьте 250 мкл ligation buffer (LFB), чтобы промыть шарики. Перемешайте вручную и поместите на магнитный штатив, чтобы получить гранулы. Когда элюат станет прозрачным и бесцветным, удалите супернатант с помощью пипетки.
32. Держите пробирку на магнитной стойке и промойте шарики, добавив 200 мкл свежеприготовленного 70-процентного этанола (в воде, свободной от нуклеаз). Используйте пипетку, чтобы удалить и выбросить 70-процентный этанол. Повторите этап стирки.
33. Не вынимая пробирку из магнитного штатива, осторожно покрутите. Не задевая шарики, осторожно уберите остаточный супернатант. Дайте шарикам высохнуть на воздухе в течение ~30 с, избегая пересушивания гранул.
34. Добавьте 17 мкл elution buffer (EB) к шарикам. Снимите пробирку со штатива и инкубируйте на ротаторе Nula Mixer, вращая в течение 10 минут при комнатной температуре.
35. Поместите пробирку на магнитный штатив, пока элюат не станет прозрачным и бесцветным.
36. Перенесите 15 мкл элюата в новую микроцентрифужную пробирку на 1,5 мл.
37. Проверьте концентрацию библиотеки с помощью Qubit. Концентрация должна составлять > 430 ng. Библиотека ДНК (SQK-LSK109) готова к загрузке на проточную ячейку, и не должны храниться на льду до использования.

Загрузка образца ДНК (SQK-LSK109)

1. Разморозьте sequencing buffer (SQB), loading beads (LB), flush tether (FLT) и одну пробирку flush buffer (FLB) при комнатной температуре. Затем поместите их на лед.
2. Откройте крышку кассеты MinION и вставьте одну проточную кювету. Сдвиньте крышку заливного отверстия по часовой стрелке, чтобы открыть заливное отверстие.
3. Установите пипетку P1000 на 200 мкл. Вставьте наконечник в заливочный порт и поверните колесо, чтобы извлечь 20–30 мкл буфера из заливочного порта. Убедитесь, что множество пор постоянно закрыто.
4. Приготовьте затравочную смесь: добавьте 30 мкл смешанного FLT в пробирку со смешанным FLB и перемешайте пипеткой.
5. Загрузите 800 мкл затравочной смеси в заливочный порт. Следует соблюдать осторожность, чтобы не допустить попадания пузырьков воздуха. Используйте заправленную проточную кювету в течение 5 мин.
6. Добавьте 37,5 мкл SQB, 25,5 мкл LB (тщательно перемешайте перед использованием) и 12 мкл библиотеки ДНК.
7. Откройте крышку порта для пробы SpotON и загрузите 200 мкл затравочной смеси в заправочный порт, избегая образования пузырьков воздуха.
8. Перед загрузкой перемешайте подготовленную библиотеку.

9. По каплям загрузите 75 мкл библиотеки в порт для образцов (sample port) SpotON.
10. Закройте пробоотборный порт SpotON и заливной порт (priming port). Закройте крышку MinION.

Необходимые материалы и оборудование

1. TissueLyser LT (Qiagen)
2. DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen)
3. Пробирки 1,5 мл и 2 мл
4. Стекланные шарики
5. SPRI beads
6. Covaris g-TUBE
7. NEBNext FFPE Repair Mix
8. NEBNext End Repair/dA-Tailing Module
9. NEBNext Quick Ligation Module
10. 70% ethanol
11. Nuclease-free water
12. SQK-LSK109 Ligation 1D
13. Флуорометр Qubit
14. Спектрофотометр NanoDrop
15. Настольная центрифуга
16. Биоанализатор
17. Ротатор Hula Mixer
18. Магнитный штатив
19. Термоциклер
20. MinION (Oxford Nanopore Technologies)
21. Проточная ячейка FLO-MIN106
22. Компьютер