



Отчёт о секвенировании

Услуга:	Секвенирование на MiSeq
Номер заказа:	21062851
Контактное лицо:	Константин Киселёв
Организация:	ФНЦ Биоразнообразия, Владивосток
Полученные материалы:	16 образцов геномной ДНК

Евроген Лаб

ул. Миклухо-Макляя 16/10
117997, Москва, Россия
Телефон: +7(495) 988 4086
Факс: +7(495) 988 4085
www.evrogen.ru

1. Параметры заказа

Исходные материалы

16 образцов геномной ДНК

Заказанные процедуры

1. Амплификация переменных регионов V3-V4 гена 16S рРНК с использованием праймеров, последовательности которых предоставлены Заказчиком. Подготовка к секвенированию на секвенаторах, совместимых с TruSeq (Illumina). Подготовка к секвенированию на секвенаторах, совместимых с TruSeq (Illumina).
2. Амплификация переменных регионов ITS с использованием праймеров, последовательности которых предоставлены Заказчиком. Подготовка к секвенированию на секвенаторах, совместимых с TruSeq (Illumina).
3. Секвенирование на MiSeq, набор Nano, 2 x 250 п.о.

2. Амплификация и подготовка к секвенированию

Качество полученных образцов геномной ДНК было проверено на электрофорезе в агарозном геле. В ряде образцов наблюдалась низкая концентрация ДНК. Амплификация переменных регионов гена 16S рРНК осуществлялась с помощью специфических праймеров Nxt-515FB: 5'-GTGYCAGCMGCCGCGGTAA-3' и Nxt-806RB: 5'-GGACTACNVGGGTWTCTAAT-3'. Амплификация переменных регионов ITS – с помощью праймеров ITS1f: 5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3' и ITS2: 5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3'. Подготовка библиотек к секвенированию проводилась в соответствии с протоколом, описанным в руководстве «16S Metagenomic Sequencing Library Preparation» (Part # 15044223 Rev. B; Illumina).

После получения ампликонов библиотеки были очищены и смешаны эквимольно с помощью SequalPrep™ Normalization Plate Kit (ThermoFisher, Cat # A10510-01). Контроль качества полученных пулов библиотек был проведен с помощью системы Fragment Analyzer, количественный анализ - при помощи qPCR.

3. Секвенирование

Пул библиотек был секвенирован на Illumina MiSeq (длина прочтений - 250 п.о. с двух сторон фрагментов) с использованием реактивов MiSeq Reagent Kit v2 Nano (500 cycles). Файлы FASTQ были получены с помощью ПО bcl2fastq v2.17.1.14 Conversion Software (Illumina).

После фильтрации данных было получено 1 233 474 чтения, количество пар чтений по образцам приведено в Приложении 1 (Appendix 1). По результатам секвенирования отрицательного контроля рекомендуем исключить из анализа образцы с количеством чтений менее 300. Для контроля параметров секвенирования использовалась библиотека фага PhiX. Большая часть прочтений, относящаяся к фаговой ДНК, была удалена в процессе демультимплексирования. Однако, в конечных данных допустимо присутствие небольшого количества прочтений, соответствующих фагу.

4. Поставка заказа

Способ передачи заказа

Данные будут доступны для загрузки с FTP до 12.08.2021 со следующими реквизитами доступа:

Адрес:	ftp.evrogen.net
Логин:	11082380
Пароль:	BnVXta1
Директория:	21062851