



Отчёт о секвенировании

Услуга:	Секвенирование на MiSeq
Номер заказа:	21101251
Контактное лицо:	Константин Киселёв
Организация:	ФНЦ Биоразнообразия, Владивосток
Полученные материалы:	22 образца геномной ДНК

Евроген Лаб

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

1. Параметры заказа

Исходные материалы

22 образца 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).
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 v2, 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:

- K-16s-515F: 5'- GGTAATACGKAGGKKGCDAGC-3';

- K-16s-806R: 5'- RTGGACTACCAGGGTATCTAA-3'.

Амплификация переменных регионов ITS – с помощью праймеров:

- ITS1f: 5'- CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3';

- ITS2: 5' -GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3'.

Подготовка библиотек к секвенированию проводилась для 22 образцов с обеими парами праймеров 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 (500 cycles). Файлы FASTQ были получены с помощью ПО bcl2fastq v2.17.1.14 Conversion Software (Illumina).

После фильтрации данных было получено 13 335 508 чтений, 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 1000. 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 12.11.2021 со следующими реквизитами доступа:

Адрес: ftp.evrogen.net

Логин: 11082380

Пароль: BnVXta1

Директория: 21101251