

Отчет о секвенировании

Услуга: Секвенирование на MiSeq Illumina

Контактное лицо: Константин Киселев

Организация: ФНЦ Биоразнообразия

Полученные материалы: образцы тотальной ДНК из ели и винограда.

127434, Москва, Тимирязевская 42,

Компания СИНТОЛ

Тел.:

- +7 (495) 984-69-93 многоканальный
 - +7 (499) 977-74-55
 - +7 (495) 506-79-97

Факс:

- +7 (495) 984-69-93
- +7 (499) 977-74-55

E-mail:

syntol@syntol.ru
syntol@mail.ru

1. Исходный материал:

62 образца тотальной ДНК из почв (заказчик самостоятельно выполнил выделение ДНК).

Проведена проверка качества и количества ДНК. Наличие продукта оценено постановкой ПЦР.

Измерение концентраций ДНК на флуориметре Qvantus с помощью набора на измерение двухцепочечной ДНК Promega, Каталожный №: E4870 QuantiFluor® ONE dsDNA System, 500rxn:

№	Название образца*	Тип образца	Праймер FW	Праймер RV	Объём (мкл)	нг/мкл Qvantus	Cq 16S	Cq ITS
1	needles-1,spruce #1	Метагеномная ДНК	GGTAATACGKAGGK KGCDAGC	RTGGACTACCAGG GTATCTAA	30	10.3	25	30.57
2	needles-2,spruce #1	Метагеномная ДНК	GGTAATACGKAGGK KGCDAGC	RTGGACTACCAGG GTATCTAA	30	2.52	24.73	30.16
3	branch-1,spruce #1	Метагеномная ДНК	GGTAATACGKAGGK KGCDAGC	RTGGACTACCAGG GTATCTAA	30	33.8	35.5	32.36
4	branch-2,spruce #1	Метагеномная ДНК	GGTAATACGKAGGK KGCDAGC	RTGGACTACCAGG GTATCTAA	30	36.6	35.18	32.43
5	shavings-1,spruce #1	Метагеномная ДНК	GGTAATACGKAGGK KGCDAGC	RTGGACTACCAGG GTATCTAA	30	4.62	25	27.09
6	needles-1,spruce #2	Метагеномная ДНК	GGTAATACGKAGGK KGCDAGC	RTGGACTACCAGG GTATCTAA	30	1.96	30	27.11
7	needles-2,spruce #2	Метагеномная ДНК	GGTAATACGKAGGK KGCDAGC	RTGGACTACCAGG GTATCTAA	30	3.62	35	33.71
8	branch-1,spruce #2	Метагеномная ДНК	GGTAATACGKAGGK KGCDAGC	RTGGACTACCAGG GTATCTAA	30	9.4	22	33.55
9	branch-2,spruce #2	Метагеномная ДНК	GGTAATACGKAGGK KGCDAGC	RTGGACTACCAGG GTATCTAA	30	11.7	22	30.34
10	shavings-1,spruce #2	Метагеномная ДНК	GGTAATACGKAGGK KGCDAGC	RTGGACTACCAGG GTATCTAA	30	7.58	24	29.4
11	PjI3-2	Метагеномная ДНК	GGTAATACGKAGGK KGCDAGC	RTGGACTACCAGG GTATCTAA	30	7.58	30.09	32.76
12	PjI3-3	Метагеномная ДНК	GGTAATACGKAGGK KGCDAGC	RTGGACTACCAGG GTATCTAA	30	0.398	29.46	32.67
13	PjV3-3	Метагеномная ДНК	GGTAATACGKAGGK KGCDAGC	RTGGACTACCAGG GTATCTAA	30	7.92	27.37	27.15
14	PjV3-4	Метагеномная ДНК	GGTAATACGKAGGK KGCDAGC	RTGGACTACCAGG GTATCTAA	30	9.28	27.31	27.09

15	PjS3-1	Метагеномная ДНК	GGTAATACGKAGGK KGCDAGC	RTGGACTACCAGG GTATCTAA	30	12.5	27.8 2	33.68
16	PjS3-2	Метагеномная ДНК	GGTAATACGKAGGK KGCDAGC	RTGGACTACCAGG GTATCTAA	30	11.1	28.0 8	33.59
17	PjI4-2	Метагеномная ДНК	GGTAATACGKAGGK KGCDAGC	RTGGACTACCAGG GTATCTAA	30	0	30.8 5	28.55
18	PjI4-3	Метагеномная ДНК	GGTAATACGKAGGK KGCDAGC	RTGGACTACCAGG GTATCTAA	30	0	30.8 3	28.52
19	PjV4-1	Метагеномная ДНК	GGTAATACGKAGGK KGCDAGC	RTGGACTACCAGG GTATCTAA	30	0.518	30.0 1	31.41
20	PjV4-3	Метагеномная ДНК	GGTAATACGKAGGK KGCDAGC	RTGGACTACCAGG GTATCTAA	30	0.544	29.2 2	31.59
21	PjS4-1	Метагеномная ДНК	GGTAATACGKAGGK KGCDAGC	RTGGACTACCAGG GTATCTAA	30	0.134	27.25	26.13
22	PjS4-2	Метагеномная ДНК	GGTAATACGKAGGK KGCDAGC	RTGGACTACCAGG GTATCTAA	30	0	27.21	26.17
23	Альфа-1	Метагеномная ДНК	GGTAATACGKAGGK KGCDAGC	RTGGACTACCAGG GTATCTAA	30	0.382	27.68	32.03
24	Альфа-2	Метагеномная ДНК	GGTAATACGKAGGK KGCDAGC	RTGGACTACCAGG GTATCTAA	30	0.272	27.81	32.48
25	Солярис-1	Метагеномная ДНК	GGTAATACGKAGGK KGCDAGC	RTGGACTACCAGG GTATCTAA	30	0	30.39	29.01
26	Солярис-2	Метагеномная ДНК	GGTAATACGKAGGK KGCDAGC	RTGGACTACCAGG GTATCTAA	30	0	29.76	28.14
27	лист-к-12ч-1	Метагеномная ДНК	GGTAATACGKAGGK KGCDAGC	RTGGACTACCAGG GTATCTAA	30	0	27.49	31.69
28	лист-к-12ч-2	Метагеномная ДНК	GGTAATACGKAGGK KGCDAGC	RTGGACTACCAGG GTATCTAA	30	0	27.14	31.66
29	витаплан-12ч-1	Метагеномная ДНК	GGTAATACGKAGGK KGCDAGC	RTGGACTACCAGG GTATCTAA	30	0	25.56	26.26
30	витаплан-12ч-2	Метагеномная ДНК	GGTAATACGKAGGK KGCDAGC	RTGGACTACCAGG GTATCTAA	30	0	25.57	26.24
31	AMR25-12ч-1	Метагеномная ДНК	GGTAATACGKAGGK KGCDAGC	RTGGACTACCAGG GTATCTAA	30	0	25.89	33.18
32	AMR25-12ч-2	Метагеномная ДНК	GGTAATACGKAGGK KGCDAGC	RTGGACTACCAGG GTATCTAA	30	0	26.27	32.83
33	Gordonia-12ч-1	Метагеномная ДНК	GGTAATACGKAGGK KGCDAGC	RTGGACTACCAGG GTATCTAA	30	0	28.21	36.81
34	Gordonia-12ч-2	Метагеномная ДНК	GGTAATACGKAGGK KGCDAGC	RTGGACTACCAGG GTATCTAA	30	0	27.16	38.51
35	Shingomonas-12ч-1	Метагеномная ДНК	GGTAATACGKAGGK KGCDAGC	RTGGACTACCAGG GTATCTAA	30	0.112	27.43	36.19
36	Shingomonas-12ч-2	Метагеномная ДНК	GGTAATACGKAGGK KGCDAGC	RTGGACTACCAGG GTATCTAA	30	0.198	26.76	37.05

37	трихоцин-12ч-1	Метагеномная ДНК	GGTAATACGKAGGK KGCDAGC	RTGGACTACCAGG GTATCTAA	30	0	25.84	37.79
38	трихоцин-12ч-2	Метагеномная ДНК	GGTAATACGKAGGK KGCDAGC	RTGGACTACCAGG GTATCTAA	30	0	25.82	40.38
39	Alternaria-12ч-1	Метагеномная ДНК	GGTAATACGKAGGK KGCDAGC	RTGGACTACCAGG GTATCTAA	30	0.34	25.83	N/A
40	Alternaria-12ч-2	Метагеномная ДНК	GGTAATACGKAGGK KGCDAGC	RTGGACTACCAGG GTATCTAA	30	0.266	26.1	50.64
41	Exobasidium-12ч-1	Метагеномная ДНК	GGTAATACGKAGGK KGCDAGC	RTGGACTACCAGG GTATCTAA	30	0	28.35	35.73
42	Exobasidium-12ч-2	Метагеномная ДНК	GGTAATACGKAGGK KGCDAGC	RTGGACTACCAGG GTATCTAA	30	0	28.48	35.47
43	Didymella-12ч-1	Метагеномная ДНК	GGTAATACGKAGGK KGCDAGC	RTGGACTACCAGG GTATCTAA	30	0	30.57	36.53
44	Didymella-12ч-2	Метагеномная ДНК	GGTAATACGKAGGK KGCDAGC	RTGGACTACCAGG GTATCTAA	30	0	30.34	36.43
45	лист-к-48ч-1	Метагеномная ДНК	GGTAATACGKAGGK KGCDAGC	RTGGACTACCAGG GTATCTAA	30	0	29.46	33.54
46	лист-к-48ч-2	Метагеномная ДНК	GGTAATACGKAGGK KGCDAGC	RTGGACTACCAGG GTATCTAA	30	0	29.22	33.66
47	витаплан-48ч-1	Метагеномная ДНК	GGTAATACGKAGGK KGCDAGC	RTGGACTACCAGG GTATCTAA	30	0	30.16	33.46
48	витаплан-48ч-2	Метагеномная ДНК	GGTAATACGKAGGK KGCDAGC	RTGGACTACCAGG GTATCTAA	30	0	29.40	32.98
49	AMR25-48ч-1	Метагеномная ДНК	GGTAATACGKAGGK KGCDAGC	RTGGACTACCAGG GTATCTAA	30	0	27.37	34.53
50	AMR25-48ч-2	Метагеномная ДНК	GGTAATACGKAGGK KGCDAGC	RTGGACTACCAGG GTATCTAA	30	0	27.25	35.1
51	Gordonia-48ч-1	Метагеномная ДНК	GGTAATACGKAGGK KGCDAGC	RTGGACTACCAGG GTATCTAA	30	0	32.36	35.19
52	Gordonia-48ч-2	Метагеномная ДНК	GGTAATACGKAGGK KGCDAGC	RTGGACTACCAGG GTATCTAA	30	0	32.76	35.19
53	Shingomonas-48ч-1	Метагеномная ДНК	GGTAATACGKAGGK KGCDAGC	RTGGACTACCAGG GTATCTAA	30	0.246	27.31	34.68
54	Shingomonas-48ч-2	Метагеномная ДНК	GGTAATACGKAGGK KGCDAGC	RTGGACTACCAGG GTATCTAA	30	0	27.21	34.65
55	трихоцин-48ч-1	Метагеномная ДНК	GGTAATACGKAGGK KGCDAGC	RTGGACTACCAGG GTATCTAA	30	0	32.43	31.43
56	трихоцин-48ч-2	Метагеномная ДНК	GGTAATACGKAGGK KGCDAGC	RTGGACTACCAGG GTATCTAA	30	0	32.67	29.89
57	Alternaria-48ч-1	Метагеномная ДНК	GGTAATACGKAGGK KGCDAGC	RTGGACTACCAGG GTATCTAA	30	0	27.82	29.07
58	Alternaria-48ч-2	Метагеномная ДНК	GGTAATACGKAGGK KGCDAGC	RTGGACTACCAGG GTATCTAA	30	0	27.68	31.88

59	Exobasidium-48ч-1	Метагеномная ДНК	GGTAATACGKAGGK KGCDAGC	RTGGACTACCAGG GTATCTAA	30	0	27.09	33.86
60	Exobasidium-48ч-2	Метагеномная ДНК	GGTAATACGKAGGK KGCDAGC	RTGGACTACCAGG GTATCTAA	30	0	27.15	34.17
61	Didymella-48ч-1	Метагеномная ДНК	GGTAATACGKAGGK KGCDAGC	RTGGACTACCAGG GTATCTAA	30	0	28.08	35.25
62	Didymella-48ч-2	Метагеномная ДНК	GGTAATACGKAGGK KGCDAGC	RTGGACTACCAGG GTATCTAA	30	0.13	27.81	34.35

2. Оказанные услуги:

1. Амплификация переменных регионов с использованием праймеров, последовательности которых предоставлены Заказчиком. Пробы №№ 1-62 - приготовление ДНК-библиотек на основе ампликонов с индексами Nextera и с праймерами 16S_Metagenomic, №№ 63-124 - приготовление ДНК-библиотек на основе ампликонов с индексами Nextera и с праймерами ITS.

K-16s-515F: 5'

TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGGTAATACGKAGGKKGCDAGC

K-16s-806R: 5'

GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGRTGGACTACCAGGGTATCTAA

ITS1F: 5' TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA

ITS2R: 5' GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGCTGCGTTCTTCATCGATGC

2. Индексирование:

1	needles-1,spruce #1	511	701
2	needles-2,spruce #1	511	702
3	branch-1,spruce #1	511	703
4	branch-2,spruce #1	511	704
5	shavings-1,spruce #1	511	705
6	needles-1,spruce #2	511	706
7	needles-2,spruce #2	511	707
8	branch-1,spruce #2	511	710
9	branch-2,spruce #2	511	711
10	shavings-1,spruce #2	511	712
11	PjI3-2	511	714
12	PjI3-3	511	715
13	PjV3-3	511	716
14	PjV3-4	511	718
15	PjS3-1	511	719
16	PjS3-2	511	720
17	PjI4-2	511	721
18	PjI4-3	511	722
19	PjV4-1	511	723
20	PjV4-3	511	724
21	PjS4-1	511	725

22	PjS4-2	511	727
23	Альфа-1	511	728
24	Альфа-2	511	729
25	Солярис-1	513	701
26	Солярис-2	513	702
27	лист-к-12ч-1	513	703
28	лист-к-12ч-2	513	704
29	витаплан-12ч-1	513	705
30	витаплан-12ч-2	513	706
31	AMR25-12ч-1	513	707
32	AMR25-12ч-2	513	710
33	Gordonia-12ч-1	513	711
34	Gordonia-12ч-2	513	712
35	Shingomonas-12ч-1	513	714
36	Shingomonas-12ч-2	513	715
37	трихоцин-12ч-1	513	716
38	трихоцин-12ч-2	513	718
39	Alternaria-12ч-1	513	719
40	Alternaria-12ч-2	513	720
41	Exobasidium-12ч-1	513	721
42	Exobasidium-12ч-2	513	722
43	Didymella-12ч-1	513	723
44	Didymella-12ч-2	513	724
45	лист-к-48ч-1	513	725
46	лист-к-48ч-2	513	727
47	витаплан-48ч-1	513	728
48	витаплан-48ч-2	513	729
49	AMR25-48ч-1	515	701
50	AMR25-48ч-2	515	702
51	Gordonia-48ч-1	515	703
52	Gordonia-48ч-2	515	704
53	Shingomonas-48ч-1	515	705
54	Shingomonas-48ч-2	515	706
55	трихоцин-48ч-1	515	707
56	трихоцин-48ч-2	515	710
57	Alternaria-48ч-1	515	711
58	Alternaria-48ч-2	515	712
59	Exobasidium-48ч-1	515	714
60	Exobasidium-48ч-2	515	715
61	Didymella-48ч-1	515	716
62	Didymella-48ч-2	515	718
63	needles-1,spruce #1	515	719
64	needles-2,spruce #1	515	720
65	branch-1,spruce #1	515	721
66	branch-2,spruce #1	515	722
67	shavings-1,spruce #1	515	723
68	needles-1,spruce #2	515	724

69	needles-2,spruce #2	515	725
70	branch-1,spruce #2	515	727
71	branch-2,spruce #2	515	728
72	shavings-1,spruce #2	515	729
73	PjI3-2	516	701
74	PjI3-3	516	702
75	PjV3-3	516	703
76	PjV3-4	516	704
77	PjS3-1	516	705
78	PjS3-2	516	706
79	PjI4-2	516	707
80	PjI4-3	516	710
81	PjV4-1	516	711
82	PjV4-3	516	712
83	PjS4-1	516	714
84	PjS4-2	516	715
85	Альфа-1	516	716
86	Альфа-2	516	718
87	Солярис-1	516	719
88	Солярис-2	516	720
89	лист-к-12ч-1	516	721
90	лист-к-12ч-2	516	722
91	витаплан-12ч-1	516	723
92	витаплан-12ч-2	516	724
93	AMR25-12ч-1	516	725
94	AMR25-12ч-2	516	727
95	Gordonia-12ч-1	516	728
96	Gordonia-12ч-2	516	729
97	Shingomonas-12ч-1	517	701
98	Shingomonas-12ч-2	517	702
99	трихоцин-12ч-1	517	703
100	трихоцин-12ч-2	517	704
101	Alternaria-12ч-1	517	705
102	Alternaria-12ч-2	517	706
103	Exobasidium-12ч-1	517	707
104	Exobasidium-12ч-2	517	710
105	Didymella-12ч-1	517	711
106	Didymella-12ч-2	517	712
107	лист-к-48ч-1	517	714
108	лист-к-48ч-2	517	715
109	витаплан-48ч-1	517	716
110	витаплан-48ч-2	517	718
111	AMR25-48ч-1	517	719

112	AMR25-48ч-2	517	720
113	Gordonia-48ч-1	517	721
114	Gordonia-48ч-2	517	722
115	Shingomonas-48ч-1	517	723
116	Shingomonas-48ч-2	517	724
117	трихоцин-48ч-1	517	725
118	трихоцин-48ч-2	517	727
119	Alternaria-48ч-1	517	728
120	Alternaria-48ч-2	517	729
121	Exobasidium-48ч-1	518	701
122	Exobasidium-48ч-2	518	702
123	Didymella-48ч-1	518	703
124	Didymella-48ч-2	518	704

- Парноконцевое секвенирование на платформе Illumina MiSeq, MiSeq Reagent Kit V2 500 (2x250) (124 библиотеки). PhiX control 20%. Среднее покрытие 50 000 - 100 000 рид/обр.
- Результаты секвенирования предоставляются заказчику в виде файлов с индивидуальными чтениями длиной 250 п.о. в формате FASTQ на адрес электронной почты kiselev@biosoil.ru

3. Подготовка библиотек:

Подготовка библиотек к секвенированию проводилась для 124 образцов в соответствии с протоколом, описанным в руководстве «16S Metagenomic Sequencing Library Preparation» (Part # 15044223 Rev. B; Illumina).

- Аmplification переменных регионов 16S и ITS.
Программа амплификации:
95°C 3 мин
 - 25-35 циклов:
 - 95°C - 30 сек
 - 55°C - 30 сек
 - 72°C - 30 сек
 - 72°C - 5 мин
- Очистка ПЦР с помощью частиц AMPure XP Beads.
- Индексная амплификация.
- Очистка ПЦР с помощью частиц AMPure XP Beads.
- Оценка качества приготовленных библиотек и измерение концентраций.
- Нормализация и пулирование готовых библиотек. После получения ампликонов библиотеки были очищены и смешаны эквимольно с помощью SequelPrep™ Normalization Plate Kit (ThermoFisher, Cat # A10510-01).

Контроль качества полученных пулов библиотек был проведен с помощью системы Fragment Analyzer.

4. 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).

Для контроля параметров секвенирования использовалась библиотека фага PhiX. Большая часть прочтений, относящаяся к фаговой ДНК, была удалена в процессе демultipлексирования. Однако, в конечных данных допустимо присутствие небольшого количество прочтений, соответствующих фагу.

5. Способ передачи заказа

FASTQ-файлы, содержащие полученные "сырые" сиквенсы по всем 124 библиотекам. Данные будут доступны для загрузки с Яндекс Диска до 07.06.2024 со следующими реквизитами доступа:

<https://disk.yandex.ru/d/5f8kx8PNOxqurw>