

ЛАБОРАТОРНА СТАНДАРТНА ОПЕРАЦІЙНА ПРОЦЕДУРА МЕРЕЖІ PULSENET ДЛЯ ПОВНОЇ ЕКСТРАКЦІЇ ДНК ТА КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ ОЧИЩЕНИХ ЕКСТРАКТИВ ДНК			
Документ PNL33	Ver. No. 02	Дата набуття чинності: 12/7/2021	1 Сторінка з 23

1. **Мета:** Описати основну стандартну операційну процедуру (СОП) для ручної повної екстракції ДНК з чистих одноклоніальних ізолятів кишкових бактерій за допомогою набору Qiagen DNeasy Blood & Tissue та контролю якості (КК) очищених екстрактів за допомогою Nanodrop і Qubit для цілей повногеномного секвенування (ПГС). Дана СОП полегшує міжлабораторне порівняння результатів секвенування.

2. **СФЕРА ПРИЗНАЧЕННЯ:** Для використання учасниками мережі PulseNet при виконанні ручної екстракції ДНК з кишкових організмів для подальшого подання даних ПГС до національних баз даних PulseNet та NCBI. Лабораторії можуть вносити зміни до цієї процедури за необхідності після валідації або використовувати альтернативний метод (автоматизований метод екстракції ДНК) відповідно до керівних принципів своєї лабораторії, дотримуючись мінімальних вимог до якості та кількості ДНК, зазначених у цій СОП.

3. **ВИЗНАЧЕННЯ:**
 - 3.1. **AE:** Буфер для елюювання
 - 3.2. **AL:** Буфер лізису
 - 3.3. **ATL:** Буфер для лізису тканин
 - 3.4. **AW1:** Буфер для промивання 1
 - 3.5. **AW2:** Буфер для промивання 2
 - 3.6. **BR:** Широкий діапазон
 - 3.7. **BSC:** Шафа біологічної безпеки
 - 3.8. **BSL2:** Рівень біобезпеки 2
 - 3.9. **ДНК:** Дезоксирибонуклеїнова кислота
 - 3.10. **ДНК-аза:** Дезоксирибонуклеаза
 - 3.11. **ДНК:** Дволанцюгова ДНК
 - 3.12. **ЕДТК:** Етилендіамінтетраоцтова кислота
 - 3.13. **ELB:** Буфер ферментативного лізису
 - 3.14. **GHS:** Гармонізована на глобальному рівні система
 - 3.15. **HS:** Висока чутливість
 - 3.16. **NCBI:** Національний центр біотехнологічної інформації
 - 3.17. **ПЛР:** Полімеразна ланцюгова реакція
 - 3.18. **PHL:** Лабораторія громадського здоров'я
 - 3.19. **ЗІЗ:** засоби індивідуального захисту
 - 3.20. **PulseNet Central:** Команда PulseNet в Центрі CDC, що складається з Відділу виявлення спалахів та епіднагляду та Відділу методів субтипівання наступного покоління
 - 3.21. **КК:** Контроль якості
 - 3.22. **РНКаза:** Рибонуклеаза
 - 3.23. **SDS:** Паспорт безпеки
 - 3.24. **СОП:** Стандартна операційна процедура
 - 3.25. **Тегування:** етап підготовки бібліотеки секвенування, на якому ДНК фрагментується та позначається тегамі адаптерних послідовностей
 - 3.26. **Tris-HCl:** Трис-гідрохлорид
 - 3.27. **TSA-SB:** Триптиказний соєвий агар з 5% овечої крові
 - 3.28. **ПГС:** Повногеномне секвенування

ЛАБОРАТОРНА СТАНДАРТНА ОПЕРАЦІЙНА ПРОЦЕДУРА МЕРЕЖІ PULSENET ДЛЯ ПОВНОЇ ЕКСТРАКЦІЇ ДНК ТА КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ ОЧИЩЕНИХ ЕКСТРАКТИВ ДНК			
Документ PNL33	Ver. No. 02	Дата набуття чинності: 12/7/2021	2 Сторінка з 23

4. **ОБОВ'ЯЗКИ:**

4.1. **Лабораторія громадського здоров'я PulseNet:**

- 4.1.1. Виконайте екстракцію очищеної ДНК та контроль якості з чистих одноколоніальних ізолятів кишкових бактерій для ПГС, як описано в цій СОП.
- 4.1.2. Зв'яжіться з PulseNet Central за необхідності для отримання допомоги з даною СОП у випадку підозри на проблеми з реагентами та/або підозрою на проблеми з апаратом.

4.2. **PulseNet Central:**

- 4.2.1. Надавайте підтримку ЛГЗ з усунення несправностей у разі потреби.
- 4.2.2. За необхідності повідомляйте ЛГЗ про будь-які підозри щодо проблем з реагентами.
- 4.2.3. Регулярно підтримуйте та переглядайте СОПи і публікуйте їх у SharePoint.

5. **БЕЗПЕКА:**

5.1. **Попередження щодо біобезпеки:** Патогени харчового походження здатні викликати серйозні захворювання. Завжди використовуйте принаймні практики рівня BSL2 і будьте вкрай обережні при передачі та роботі зі штамми цього типу. Носіть відповідні засоби індивідуального захисту при роботі з інфекційними організмами. Працюйте в ШББ при роботі з організмами із низькою інфекційною дозою. Дезінфікуйте або утилізуйте весь пластиковий та скляний посуд, який контактував з бактеріальними культурами.

5.2. **Попередження щодо хімічної безпеки:** Під час роботи з потенційно небезпечними хімічними речовинами вживайте необхідних заходів безпеки та використовуйте відповідні засоби індивідуального захисту. Переконайтеся, що хімікати, використані контейнери та невикористаний вміст утилізуються відповідно до державних стандартів безпеки.

- 5.2.1. РНКаз А має категорію 1 за класифікацією GHS як реагент, що викликає шкірну та респіраторну сенсибілізацію. Для отримання додаткової інформації див. паспорт безпеки.
- 5.2.2. Компоненти набору Qiagen DNeasy Kit: Додаткову інформацію див. у паспорті безпеки Qiagen.
 - 5.2.2.1. **Буфер AL:** Категорія 2 GHS для подразнення шкіри та очей. GHS категорія 1 для сенсибілізації шкіри. Містить хаотропну сіль і не сумісний із засобами, що містять відбілювач.
 - 5.2.2.2. **AW1 Буфер:** Категорія 4 за гострою токсичністю при пероральному та інгаляційному шляху потрапляння до організму. GHS Категорія 2 для подразнення шкіри та очей. Містить хаотропну сіль і не сумісний із засобами, що містять відбілювач.
 - 5.2.2.3. **Протеїназа К:** Категорія 1 GHS для респіраторної сенсибілізації.
- 5.2.3. Етанол легкозаймистий (категорія горючості 2 за класифікацією GHS); дотримуйтесь запобіжних заходів під час поводження з етанолом, його зберігання та утилізації в лабораторії.

ЛАБОРАТОРНА СТАНДАРТНА ОПЕРАЦІЙНА ПРОЦЕДУРА МЕРЕЖІ PULSENET ДЛЯ ПОВНОЇ ЕКСТРАКЦІЇ ДНК ТА КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ ОЧИЩЕНИХ ЕКСТРАКТИВ ДНК			
Документ PNL33	Ver. No. 02	Дата набуття чинності: 12/7/2021	3 Сторінка з 23

6. ВИТРАТНІ МАТЕРІАЛИ, РЕАГЕНТИ ТА ОБЛАДНАННЯ

6.1. Реагенти

ПРИМІТКА: *Всі реагенти зберігаються при температурі 20-25°C, якщо не вказано інше. Якщо не вказано інше, слід дотримуватися рекомендацій виробника щодо терміну придатності.*

- 6.1.1. TSA-SB або аналогічне середовище (Fisher Scientific Cat# B21239X, упаковка 20 шт. або еквівалент). Зберігати при 4-8°C.
- 6.1.2. Етанол, молекулярна концентрація 95-100% (Fisher Scientific Cat# BP2818-500 або еквівалент).
- 6.1.3. РНКаза А, 100 мг/мл (Qiagen Cat# 19101, 2,5 мл або еквівалент). Інформацію про безпеку див. у розділі 5.2.1.
- 6.1.4. Вода молекулярного класу, що не містить ДНК (Fisher Scientific Cat# BP24701, 1 л або еквівалент). Також можна використовувати воду, відфільтровану мілкопористим фільтром).
- 6.1.5. Трис-HCL, 1М, рН 8,0 (Fisher Scientific Cat# 15568-025, 1 л або еквівалент).
- 6.1.6. Лізоцим (Millipore Sigma Cat# L4919-1G або еквівалент), зберігати при -20°C.
- 6.1.7. ЕДТА, 0,5М (Millipore Sigma Cat# 324506-100ML).
- 6.1.8. Тритон X-100 (Fisher Scientific Cat# BP151-100, 100 мл).
- 6.1.9. Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen Cat# 69504 (50 екстрактів) або 69506 (250 екстрактів)).
 - 6.1.9.1. Буфер AL (див. розділ 5.2.2.1 для отримання інформації про безпеку).
 - 6.1.9.2. Буфер ATL.
 - 6.1.9.3. Протеїназа К (див. розділ 5.2.2.3 для інформації про безпеку).
 - 6.1.9.4. Буфер AWI (див. розділ 5.2.2.2 для отримання інформації про безпеку).
 - 6.1.9.5. AW2 Буфер.
 - 6.1.9.6. Збірні трубки.
 - 6.1.9.7. Спінові колонки.
- 6.1.10. Набір для аналізу DNA BR Qubit (Fisher Scientific Cat# Q32850 (100 аналізів) або Q32853 (500 аналізів)).
 - 6.1.10.1. Реагент dsDNA BR (Компонент А). Захищати від світла.
 - 6.1.10.2. Буфер dsDNA BR (Компонент В).
 - 6.1.10.3. dsDNA BR Стандарт №1 (Компонент С). Зберігати при 2-8°C.
 - 6.1.10.4. dsDNA BR Стандарт №2 (Компонент D). Зберігати при 2-8°C.
- 6.1.11. **ОПЦІЙНО:** Qubit 1X dsDNA тест-набори, широкий спектр (BR) (Fisher Scientific Cat# Q33265 (100 аналізів) або Q33266 (500 аналізів)).
- 6.1.12. **®ОПЦІЙНО:** Набір для очищення та концентрації геномної ДНК -5 (Zymo Research Cat# D4013 (50 препаратів) або D4014 (200 препаратів)).
- 6.1.13. **ОПЦІЙНО:** Набір для очищення геномної ДНК Promega Wizard® (Promega Cat# A1120 (100 екстрактів) або A1125 (500 екстрактів)).
 - 6.1.13.1. Додаткові реагенти та витратні матеріали, необхідні для набору Promega:
 - 6.1.13.1.1. Ізопропанол 99-100 % (Fisher Scientific Cat# BP26324, 4 л).
 - 6.1.13.1.2. Лід.

ЛАБОРАТОРНА СТАНДАРТНА ОПЕРАЦІЙНА ПРОЦЕДУРА МЕРЕЖІ PULSENET ДЛЯ ПОВНОЇ ЕКСТРАКЦІЇ ДНК ТА КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ ОЧИЩЕНИХ ЕКСТРАКТИВ ДНК			
Документ PNL33	Ver. No. 02	Дата набуття чинності: 12/7/2021	4 Сторінка з 23

6.2. Витратні матеріали

- 6.2.1. 1 мкл петлі для інокуляції (Fisher Scientific Cat# 22-363-604, упаковка 960 шт. або еквівалент).
- 6.2.2. Мікроцентрифужні пробірки на 1,5 мл (Fisher Scientific Cat № 05-408-129, упаковка 500 шт. або еквівалент) **ПРИМІТКА:** *Перед використанням простерилізуйте ці пробірки в автоклаві.*
- 6.2.3. Пробірки по 5 мл (Fisher Scientific Cat № 14-959-11A, упаковка 500 шт. або еквівалент).
- 6.2.4. Наконечники для дозаторів, з фільтром: об'ємом 10 мкл, 20 мкл, 200 мкл та 1000 мкл (Rainin Cat# 30389225, 30389239 та 30389212 або еквівалент).
- 6.2.5. Пробірки Qubit [Fisher Scientific Cat# Q32856, упаковка з 500 пробірок або еквівалент (прозорі, тонкостінні пробірки для ПЛР об'ємом 0,5 мл)].
- 6.2.6. Безворсові лабораторні серветки (Fisher Scientific Cat № 06-666C, упаковка 140 шт. або еквівалент).

6.3. Обладнання

- 6.3.1. Інкубатор (35-37°C).
- 6.3.2. Вортекс.
- 6.3.3. Водяна баня або термоблок, що вміщує 1,5 мл мікроцентрифужні пробірки і здатний підтримувати температуру 56^(o) C ± 1°C.
- 6.3.4. Центрифуга, що вміщує пробірки об'ємом 1,5-2 мл і працює зі швидкістю до 13 000-14 000 об/хв.
- 6.3.5. Аналітичні ваги з дискретністю 0,1 мг.
- 6.3.6. Мікродозатори, одноканальні: об'єми 10 мкл, 20 мкл, 200 мкл, 1000 мкл.
- 6.3.7. TMФлуориметр Qubit 4.0 (старіші версії 2.0 або 3.0) або еквівалент для кількісного визначення dsDNA.
- 6.3.8. TM NanoDrop 2000 UV-Vis/NanoDrop One спектрофотометр або еквівалент для визначення показань при довжині хвилі 260/280 нм.

7. ПРОЦЕДУРА

- 7.1. **Підготовка ізоляту:** Секвенування необхідно проводити з однієї колонії. Підготуйте виділені колонії, наносячи смужки на планшет для виділення та перевірки чистоти з вихідного планшета згідно з методами вашої лабораторії.

ПРИМІТКА: *Мінімізуйте кількість пасажів зі скельця на планшет для екстракції ДНК.*

- 7.1.1. Перенесіть виділену колонію з чистого планшета на планшет TSA-SB (або аналогічне середовище) та інкубуйте при 37°C ± 1 протягом 16-24 годин.

7.2. Виділення ДНК за допомогою набору Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kit

®ПРИМІТКА 1: *Якщо ви використовуєте процедуру екстракції ДНК Promega Wizard, див. Додаток PNL33-1. Для завершення процесу з використанням цього набору необхідно виділити мінімум 4-6 годин.*

ПРИМІТКА2: *Екстракти ДНК, які будуть використовуватися для підготовки бібліотеки WGS і секвенування, не повинні містити ЕДТА. Ця хімічна речовина*

ЛАБОРАТОРНА СТАНДАРТНА ОПЕРАЦІЙНА ПРОЦЕДУРА МЕРЕЖІ PULSENET ДЛЯ ПОВНОЇ ЕКСТРАКЦІЇ ДНК ТА КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ ОЧИЩЕНИХ ЕКСТРАКТИВ ДНК			
Документ PNL33	Ver. No. 02	Дата набуття чинності: 12/7/2021	5 Сторінка з 23

пригнічує певні процеси під час підготовки бібліотеки (напр., мічення) і міститься в буферах для елюювання/регідратації багатьох комерційних наборів. ЕДТК інактивує ферменти та/або буфери шляхом хелатування з іонами металів, що містяться в цих реагентах. Саме з цієї причини 10 мМ трис-НСІ, рН 8,0, використовується як буфер для елюювання замість буфера для елюювання, що входить до складу набору для екстракції.

7.2.1. Перед початком цієї процедури, по-перше:

- 7.2.1.1. Попередньо нагрійте водяну баню або термоблок до $56^{\circ}\text{C} \pm 1$.
- 7.2.1.2. Переконайтеся, що реагенти набору DNeasy підготовлені. Якщо ні, розбавте їх етанолом (молекулярна концентрація 95-100%), якщо необхідно, дотримуючись протоколу в інструкції до набору. Проставте ініціали і дату на флаконах після розведення для ведення обліку, а також вказівки на те, що реагенти готові до використання.
- 7.2.1.3. Приготуйте буфер для елюювання, 10 мМ трис-НСІ, рН 8,0, наступним чином:
 - 7.2.1.3.1. Додайте 10 мл 1 М трис-НСІ, рН 8,0 до 990 мл молекулярної води.
 - 7.2.1.3.2. Переверніть кілька разів, щоб перемішати.
 - 7.2.1.3.3. Зберігати при температурі $2-8^{\circ}\text{C}$ до одного року (на пробірці вказати ініціали, дату приготування та термін придатності).

7.2.2. Лізис клітин грампозитивних організмів:

- 7.2.2.1. Приготуйте буфер для ферментативного лізису (ELB), що складається з 20ммоль трис-НСІ, 2ммоль ЕДТК, 1,2% розчину Triton:
 - 7.2.2.1.1. Поєднайте наступне:
 - 5 мл 1 М трис-НСІ, рН 8,0
 - 1 мл 0,5 М ЕДТК
 - 3 мл Triton X-100
 - 241 мл молекулярної води
 - 7.2.2.1.2. Обережно перемішайте, щоб додати Triton X (за бажанням це можна зробити за допомогою мішалки або пластини для перемішування). Зберігати при кімнатній температурі до одного року.
- 7.2.2.2. Приготуйте розчин лізоциму ELB, додавши лізоцим до відповідного об'єму ELB для досягнення концентрації лізоциму 20 мг/мл. Нижченаведена таблиця може бути використана як орієнтир. Ретельно перемішайте розчин ELB-лізоциму перед дозуванням.

ПРИМІТКА1: Підвищення ефективності спостерігається після того, як розчин ELB-Лізоциму інкубується при кімнатній температурі протягом 20-30 хвилин.

ПРИМІТКА2: Розчин необхідно використати протягом 24 годин після приготування.

ЛАБОРАТОРНА СТАНДАРТНА ОПЕРАЦІЙНА ПРОЦЕДУРА МЕРЕЖІ PULSENET ДЛЯ ПОВНОЇ ЕКСТРАКЦІЇ ДНК ТА КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ ОЧИЩЕНИХ ЕКСТРАКТІВ ДНК			
Документ PNL33	Ver. No. 02	Дата набуття чинності: 12/7/2021	6 Сторінка з 23

Кількість зразків + 1 додатковий	Загальний об'єм ELB (мкл)	Лізоцим (мг)
(5+1) = 6	1080	21.6
(10+1) = 11	1980	39.6
(18+1) = 19	3420	68.4
(20+1) = 21	3780	75.6

Таблиця 1: Загальний об'єм ELB та лізоциму, необхідний для різної кількості зразків.

- 7.2.2.3. Розподіліть 180 мкл підготовленої суміші ELB-лізоциму в кожен промарковану мікроцентрифужну пробірку об'ємом 1,5 мл.
- 7.2.2.4. Наповніть 1 мкл петлі для посіву культурою для нічного росту (див. зображення нижче), додайте її до 180 мкл суміші ELB-лізоциму в 1,5 мл стерильної мікроцентрифужної пробірки. Прокрутіть на високій швидкості протягом приблизно 5-10 секунд.



Рисунок 1: Рекомендована кількість бактеріальної культури на ніч в 1 мкл петлі для посіву для екстракції ДНК

- 7.2.2.5. Інкубуйте при $56^{\circ}\text{C} \pm 1$ протягом 30 хвилин.
ПРИМІТКА: Для покращення лізису клітин рекомендується змішувати на вортексі кожні 10 хвилин протягом усього процесу інкубації.
- 7.2.2.6. Додайте 4 мкл розчину РНКазі А і прокрутіть на вортексі на середній швидкості (напр., швидкість "7" на Daigger Vortex Genie) протягом 5-10 секунд.
- 7.2.2.7. Інкубуйте при кімнатній температурі протягом 3-5 хвилин.
- 7.2.2.8. Додайте 25 мкл протеїнази К і 200 мкл AL буфера і змішуйте на вортексі 5-10 секунд на середній швидкості.
ПРИМІТКА: Для збільшення виходу ДНК змішуйте на вортексі відразу після додавання буфера AL до кожного зразка. НЕ рекомендується проводити вібрацію до додавання буфера AL до всіх зразків.
- 7.2.2.9. Інкубуйте при $56^{\circ}\text{C} \pm 1$ протягом 30 хвилин.
- 7.2.2.10. Додайте 200 мкл 95-100% етанолу і змішуйте на вортексі протягом 5-10 секунд на середній швидкості. Перейдіть до розділу 7.2.4.

ЛАБОРАТОРНА СТАНДАРТНА ОПЕРАЦІЙНА ПРОЦЕДУРА МЕРЕЖІ PULSENET ДЛЯ ПОВНОЇ ЕКСТРАКЦІЇ ДНК ТА КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ ОЧИЩЕНИХ ЕКСТРАКТИВ ДНК			
Документ PNL33	Ver. No. 02	Дата набуття чинності: 12/7/2021	7 Сторінка з 23

ПРИМІТКА: При додаванні етанолу може утворитися прозорий або білий осад. Важливо перенести весь осад на спінову колонку DNeasy на наступному етапі (розділ 7.2.4.1.).

7.2.3. Лізис клітин грамнегативних організмів:

- 7.2.3.1. Розподіліть 180 мкл буфера ATL у промарковані стерильні мікроцентрифужні пробірки об'ємом 1,5 мл.
- 7.2.3.2. Наповніть 1 мкл петлі для посіву культурою нічного росту (Рис. 1), додайте її до 180 мкл буфера ATL в 1,5 мл мікроцентрифужній пробірці і прокрутіть на високій швидкості приблизно 5-10 секунд.
- 7.2.3.3. Додайте 20 мкл протеїнази K в кожну пробірку для зразків і прокрутіть на високій швидкості протягом 5-10 секунд.
- 7.2.3.4. Інкубуйте при $56\text{ C} \pm 1$ протягом 1-3 годин, змішуючи на вортексі кожні 20 хвилин протягом усього процесу інкубації для покращення лізису клітин.
- 7.2.3.5. Додайте 4 мкл розчину РНКаз А і змішуйте на вортексі на середній швидкості (наприклад, '7' на Daigger Vortex Genie) протягом 5-10 секунд.
- 7.2.3.6. Інкубуйте при кімнатній температурі протягом 3-5 хвилин.
- 7.2.3.7. Додайте 200 мкл буфера AL і змішуйте на вортексі протягом 5-10 секунд.
ПРИМІТКА: Для збільшення виходу ДНК змішуйте на вортексі відразу після додавання буфера AL до кожного зразка. НЕ рекомендується проводити вібрацію до додавання буфера AL до всіх зразків.
- 7.2.3.8. Додайте 200 мкл 95% - 100% етанолу і змішуйте на вортексі 5-10 секунд.
ПРИМІТКА: При додаванні буфера AL може утворитися прозорий або білий осад. Важливо нанести весь осад на спінову колонку DNeasy на наступному етапі.

7.2.4. Очищення та елювання ДНК:

- 7.2.4.1. Вилийте суміш у спінову колонку DNeasy, встановлену в пробірку для збору на 2 мл.
ПРИМІТКА: Переконайтеся, що суміш добре суспендована перед перенесенням на спінову колонку.
- 7.2.4.2. Центрифугуйте при 10 000 об/хв протягом 1 хвилини і викиньте проточну та збірну пробірки.
- 7.2.4.3. Помістіть спінову колонку DNeasy в нову пробірку на 2 мл і додайте 500 мкл буфера AW1 (перед використанням буфер кілька разів переверніть, щоб перемішати).
- 7.2.4.4. Центрифугуйте при 10 000 об/хв протягом 1 хвилини і викиньте проточну пробірку та пробірки відбору.
- 7.2.4.5. Помістіть спінову колонку DNeasy в нову пробірку на 2 мл і додайте 500 мкл буфера AW2 (перед використанням буфер кілька разів переверніть, щоб перемішати).
- 7.2.4.6. Центрифугуйте при 13 000 - 14 000 об/хв протягом 3 хвилин, щоб зібрати проточну рідину в пробірці і висушити мембрану. Викиньте проточну пробірку та пробірки відбору.

ЛАБОРАТОРНА СТАНДАРТНА ОПЕРАЦІЙНА ПРОЦЕДУРА МЕРЕЖІ PULSENET ДЛЯ ПОВНОЇ ЕКСТРАКЦІЇ ДНК ТА КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ ОЧИЩЕНИХ ЕКСТРАКТИВ ДНК			
Документ PNL33	Ver. No. 02	Дата набуття чинності: 12/7/2021	8 Сторінка з 23

НЕОБОВ'ЯЗКОВО: На цьому етапі підготуйте пробірку з достатньою кількістю 10 ммоль трис-НСІ рН 8,0 для 100 мкл на зразок + 1 додаткова пробірка і інкубуйте при 56°C ± 1°C під час центрифугування зразків. Це робиться для того, щоб довести буфер для елюювання (10 мМ TRis-НСІ рН 8,0) до оптимальної температури елюювання.

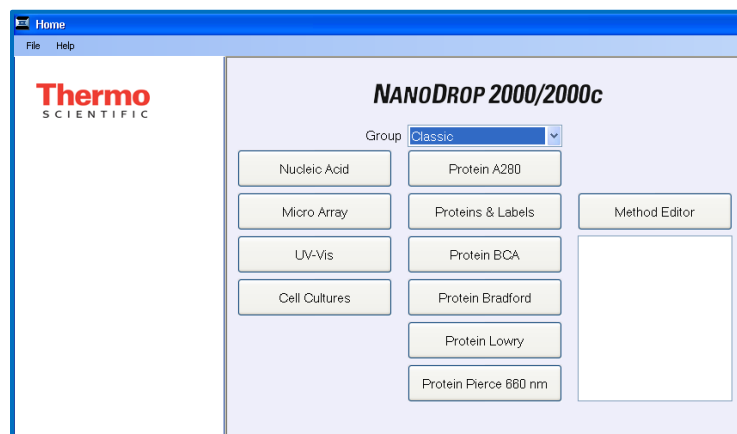
- 7.2.4.7. Помістіть спінову колонку DNeasy в чисту, промарковану мікроцентрифужну пробірку на 1,5 мл і додайте 100 мкл попередньо підігрітого 10 ммоль трис-НСІ рН 8,0 безпосередньо на мембрану DNeasy. Не торкайтеся мембрани кінчиком дозатора.
- 7.2.4.8. Інкубуйте при кімнатній температурі протягом 3 - 5 хв.
- 7.2.4.9. Центрифугуйте при 10 000 - 11 000 об/хв протягом 1 хвилини, щоб зібрати елюат в нову пробірку.
- 7.2.4.10. В цей час можна перевірити якість і кількість ДНК. Якщо секвенування ДНК необхідно провести протягом 1 тижня після екстракції, її можна зберігати при температурі 2 - 8°C. Для довготривалого зберігання зберігайте при температурі від -15 до -80°C і уникайте повторного заморожування-розморожування.

7.3. Контроль якості ДНК

7.3.1. [™]Визначення якості ДНК за допомогою спектрофотометра NanoDrop 2000.

- 7.3.1.1. Виберіть піктограму NanoDrop 2000 на робочому столі робочої станції NanoDrop. Оберіть відповідну програму на екрані, в даному випадку "нуклеїнові кислоти", і дотримуйтесь підказок, щоб почати ініціалізацію. На запитання, чи хочете ви відкрити останню робочу книгу, виберіть "так", якщо хочете додати результати до раніше збережених даних, або виберіть "ні", якщо хочете почати нову робочу книгу.

ПРИМІТКА: Під час ініціалізації ручка NanoDrop повинна бути опущена вниз.



[™]Рисунок 2: Знімок екрану з роботою NanoDrop 2000

- 7.3.1.2. Підніміть кронштейн NanoDrop і за допомогою безворсової лабораторної серветки, змоченої дистильованою H₂O, протріть верхній і нижній столики.

ЛАБОРАТОРНА СТАНДАРТНА ОПЕРАЦІЙНА ПРОЦЕДУРА МЕРЕЖІ PULSENET ДЛЯ ПОВНОЇ ЕКСТРАКЦІЇ ДНК ТА КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ ОЧИЩЕНИХ ЕКСТРАКТИВ ДНК			
Документ PNL33	Ver. No. 02	Дата набуття чинності: 12/7/2021	9 Сторінка з 23

- 7.3.1.3. Нанесіть дозатором 1-2 мкл холостого розчину (напр., 10 мМ трис-НСІ, рН 8,0) на нижній столик і опустіть кронштейн після завантаження. Переконайтеся, що у верхньому лівому квадранті екрану вибрано "Add to report" (Додати до звіту), щоб вимірювання були збережені, і натисніть кнопку "Blank" (холостий) на екрані (верхній лівий кут).
ПРИМІТКА: *Переконайтеся, що в зразку на підставці немає бульбашок, щоб отримати точні результати.*

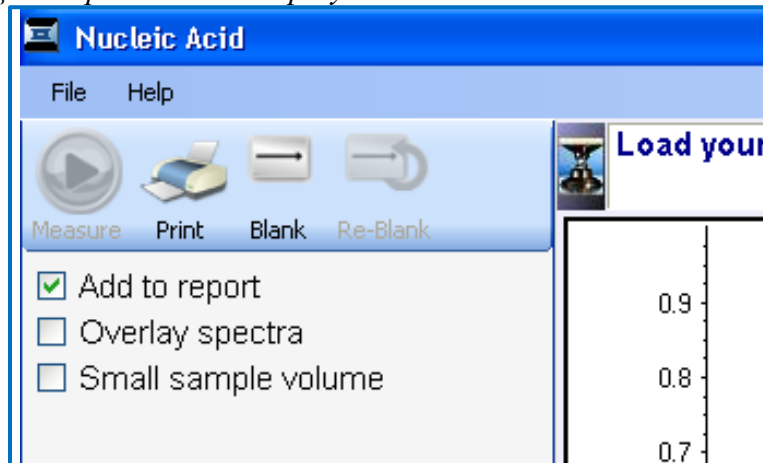


Рисунок 3: Знімок екрану роботи NanoDrop 2000 (продовження)

- 7.3.1.4. Після того, як прилад зчитав холосту пробу, підніміть руку і протріть підставку і руку сухою лабораторною серветкою, щоб підготувати NanoDrop до вимірювання зразків.
- 7.3.1.5. Нанесіть піпеткою 1-2 мкл нерозведеного зразка ДНК на нижній столик і опустіть руку.
- 7.3.1.6. Введіть назву зразка в поле "Sample ID" (праворуч вгорі) і натисніть "Measure" (ліворуч вгорі). Коли вимірювання буде виконано, на екрані з'являться результати.
- 7.3.1.7. Після вимірювання першого зразка з'явиться підказка: дотримуйтесь підказки, щоб зберегти робочу книгу. Робоча книга повинна бути збережена перед тим, як продовжити роботу.
- 7.3.1.8. Протріть обидві підставки чистою безворсовою серветкою, змоченою деіонізованою водою, і повторіть кроки 7.3.1.5 - 7.3.1.8 для всіх зразків.
- 7.3.1.9. Після вимірювання всіх зразків натисніть на піктограму "Звіти" в лівому нижньому квадранті екрану, щоб роздрукувати та/або експортувати дані, якщо потрібно.
- 7.3.1.10. Запишіть дані шляхом електронного експорту, як описано нижче, або вручну.
- 7.3.1.10.1. Натисніть на іконку "Звіти" в нижньому лівому квадранті екрану.
- 7.3.1.10.2. Виберіть "Експорт".
- 7.3.1.10.3. Збережіть робочу книгу NanoDrop у відповідному мережевому просторі або на флеш-накопичувачі.
- 7.3.1.11. Перенесіть дані до відповідного журналу або робочої книги підготовки бібліотеки ПГС.

ЛАБОРАТОРНА СТАНДАРТНА ОПЕРАЦІЙНА ПРОЦЕДУРА МЕРЕЖІ PULSENET ДЛЯ ПОВНОЇ ЕКСТРАКЦІЇ ДНК ТА КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ ОЧИЩЕНИХ ЕКСТРАКТИВ ДНК			
Документ PNL33	Ver. No. 02	Дата набуття чинності: 12/7/2021	10 Сторінка з 23

7.3.1.12. Показники для поля 260/280 повинні бути між **1,75 і 2,05 (це включає 0,05 або 3% похибки)** для того, щоб виділена ДНК була визнана "чистою" і придатною для ПГС. Якщо співвідношення нижче 1,75, це може вказувати на наявність білка, фенолу або інших забруднювачів, які мають сильну абсорбцію при довжині хвилі 280 нм або поблизу неї.

ПРИМІТКА 1: *Якщо значення 260/280 постійно знаходяться в межах діапазону протягом декількох циклів, то немає необхідності регулярно зчитувати значення на NanoDrop для наступних екстракцій.*

ПРИМІТКА 2: *якщо значення 260/280 виходять за межі допустимого діапазону, екстракт ДНК можна очистити за допомогою набору Zymo DNA Clean & Concentrator®-5 (інструкції див. у Додатку PNL33-2).*

7.3.2. [™]Визначення якості ДНК за допомогою спектрофотометра NanoDrop One

7.3.2.1. Торкніться екрану, щоб активувати прилад.

7.3.2.2. Виберіть вкладку "Нуклеїнові кислоти" на головному екрані.

7.3.2.3. Виберіть "dsDNA".

7.3.2.4. Підніміть кронштейн приладу і протріть верхній і нижній столики новою безворсовою лабораторною серветкою, змоченою дистильованою Н(2)О.

7.3.2.5. Нанесіть 1-2 мкл холостого розчину (наприклад, 10 ммоль трис-НСІ, рН 8,0) на нижній столик і опустіть кронштейн.

7.3.2.6. Зачекайте, поки прилад виконає етап автоматичного очищення.

ПРИМІТКА: *Для цього приладу увімкнено функцію автоматичного холостого ходу. Не змінюйте це налаштування. Якщо функцію було вимкнено, торкніться "Blank/Холостий" і зачекайте, поки вимірювання завершиться.*

7.3.2.7. Підніміть кронштейн і протріть обидві підставки лабораторною безворсовою серветкою без ворсу.

7.3.2.8. Торкніться поля "Назва зразка/Sample Name", щоб відобразити клавіатуру.

7.3.2.9. Введіть назву зразка.

7.3.2.10. Натисніть "Готово/Done".

7.3.2.11. Нанесіть 1-2 мкл зразка ДНК і опустіть кронштейн.

7.3.2.12. Зачекайте, поки прилад виконає крок автоматичного вимірювання.

ПРИМІТКА: *Для цього приладу функцію автоматичного вимірювання увімкнено. Не змінюйте це налаштування. Якщо автоматичне вимірювання було вимкнено, торкніться "Виміряти/Measure" і дочекайтеся завершення вимірювання.*

7.3.2.13. Повторюйте кроки 7.3.2.7 - 7.3.2.12, доки не будуть виміряні всі зразки.

7.3.2.14. Натисніть "Завершити експеримент" після вимірювання всіх зразків.

7.3.2.15. Підніміть кронштейн і протріть обидва столики чистою безворсовою серветкою, змоченою дистильованою водою.

7.3.2.16. Запишіть дані шляхом електронного експорту, як описано нижче, або вручну.

ПРИМІТКА: *Наступні кроки детально описують експорт даних одразу після закінчення експерименту. [™]Зверніться до Посібника користувача*

ЛАБОРАТОРНА СТАНДАРТНА ОПЕРАЦІЙНА ПРОЦЕДУРА МЕРЕЖІ PULSENET ДЛЯ ПОВНОЇ ЕКСТРАКЦІЇ ДНК ТА КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ ОЧИЩЕНИХ ЕКСТРАКТИВ ДНК			
Документ PNL33	Ver. No. 02	Дата набуття чинності: 12/7/2021	11 Сторінка з 23

NanoDrop One для отримання інструкцій щодо збереження експерименту для експорту пізніше.

- 7.3.2.16.1. Вставте накопичувач в USB-порт.
- 7.3.2.16.2. Торкніться "Експорт" і виберіть формат файлу .csv.
- 7.3.2.16.3. Знову натисніть "Експортувати".
- 7.3.2.16.4. Натисніть "ОК" після того, як з'явиться повідомлення про успішний експорт.
- 7.3.2.16.5. Вийміть накопичувач.
- 7.3.2.16.6. Натисніть "Завершити експеримент".
- 7.3.2.17. Перенесіть дані у відповідний журнал, робочий аркуш або книгу підготовки бібліотеки WGS.
- 7.3.2.18. Показники для поля 260/280 повинні бути в межах від **1,75 до 2,05 (це включає в себе 0,05 або 3% похибки)**, щоб виділена ДНК була визнана "чистою" і придатною для ПГС. Якщо співвідношення нижче 1,75, це може вказувати на наявність білка, фенолу або інших забруднювачів, які сильно поглинають при довжині хвилі 280 нм або поблизу неї.
ПРИМІТКА 1: Якщо значення 260/280 постійно знаходяться в межах діапазону протягом декількох циклів, то немає необхідності регулярно зчитувати значення на *NanoDrop* для наступних екстракцій.
ПРИМІТКА 2: якщо значення 260/280 виходять за межі допустимого діапазону, екстракт ДНК можна очистити за допомогою набору *Zymo DNA Clean & Concentrator®-5* (інструкції див. у Додатку PNL33-2).

7.3.3. TMПідготовка зразків і стандартів для кількісного визначення ДНК за допомогою флуориметра Qubit 2.0, 3.0 або 4.0

ПРИМІТКА1: *Набір широкого діапазону (BR)* розроблений для точного визначення початкових концентрацій зразків від 100 нг/мкл до 1 000 нг/мкл. Використовуйте для кількісного визначення продуктів, що містять більш високі концентрації ДНК (наприклад, екстракції геномної ДНК).

ПРИМІТКА2: *Високочутливий набір (HS)* призначений для точного визначення початкових концентрацій зразків від 10 нг/мкл до 100 нг/мкл. Використовуйте для кількісного визначення продукту, що містить меншу концентрацію ДНК (наприклад, ПЛР-продукт, бібліотека секвенування ДНК).

- 7.3.3.1. Підготуйте і промаркуйте по одній пробірці для кожного зразка і двох стандартів.
- 7.3.3.2. Приготуйте робочий розчин Qubit, використовуючи співвідношення реагенту Qubit і буфера Qubit 1:200 для кожного зразка і двох стандартів. Приклад розрахунків наведено в Таблиці 2.
ПРИМІТКА: *Зберігайте реагент HS/BR в захищеному від світла місці, оскільки він містить флуоресцентні компоненти.*

ЛАБОРАТОРНА СТАНДАРТНА ОПЕРАЦІЙНА ПРОЦЕДУРА МЕРЕЖІ PULSENET ДЛЯ ПОВНОЇ ЕКСТРАКЦІЇ ДНК ТА КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ ОЧИЩЕНИХ ЕКСТРАКТИВ ДНК			
Документ PNL33	Ver. No. 02	Дата набуття чинності: 12/7/2021	12 Сторінка з 23

Реагенти	1x	Приклад: 8 зразків + 2 стандарти
Реагент Qubit HS або BR	1 мкл	= 10 мкл
Буфер Qubit HS або BR	199 мкл	= 1990 мкл
Загальний об'єм (робочий розчин)	200 мкл	= 2000 мкл

Таблиця 2: Загальний об'єм реагенту Qubit та буферу, необхідний для приготування робочого для 8 зразків і 2 стандартів

ПРИМІТКА: Рекомендується збільшити кількість зразків, що використовуються в розрахунках, принаймні на один, щоб забезпечити достатній об'єм.

- 7.3.3.3. Для кожного стандарту розведіть 190 мкл робочого розчину і додайте 10 мкл стандартів Qubit у відповідні пробірки.
- 7.3.3.4. Розподіліть 198 мкл робочого розчину і 2 мкл вхідної ДНК в кожен пробірку зі зразком. Кінцевий об'єм для кожного зразка і стандарту повинен становити 200 мкл.
- 7.3.3.5. Прокрутіть всі пробірки вортексом протягом 2-3 секунд.
- 7.3.3.6. Інкубуйте всі пробірки мінімум 2 хвилини при кімнатній температурі і зчитуйте результати протягом 1 години. Короткий проміжок часу необхідний для мінімізації впливу світла на реагент.

ПРИМІТКА 1: Переконайтеся, що аналіз виконується повністю при кімнатній температурі. Не нагрівайте і не тримайте пробірки в руці перед вимірюванням, оскільки нагрівання розчину призводить до зниження показників.

ПРИМІТКА 2: Температура всередині флуориметра Qubit може бути на 3°C вище кімнатної через 1 годину. З цієї причини, якщо ви хочете виконати кілька вимірювань в одній пробірці, вийміть пробірку з приладу і дайте їй врівноважитися до кімнатної температури протягом 30 секунд, перш ніж робити наступні вимірювання.

7.3.4. **ТМРобота флуориметра Qubit 2.0**

- 7.3.4.1. Торкніться екрану, щоб активувати пристрій.
- 7.3.4.2. Коли з'явиться запит на вибір типу зразка, виберіть "ДНК".
- 7.3.4.3. Коли з'явиться запит на вибір типу аналізу, виберіть "Широкий діапазон ДНК" або "Висока чутливість ДНК" в залежності від використовуваного аналізу.
- 7.3.4.4. У відповідь на запитання, чи доступні нові стандарти, виберіть "Так".
- 7.3.4.5. Вставте стандарт 1 і натисніть "Read".
- 7.3.4.6. Вставте стандарт 2 і натисніть "Read".

ПРИМІТКА: Якщо прилад не може зчитати стандарти, почніть процес спочатку, підготувавши нові стандарти і зразки, використовуючи інструкції, описані в кроці 7.3.3.

- 7.3.4.7. Вставте пробірку зі зразком в камеру для зразків, закрийте кришку і натисніть кнопку "Read" (Зчитування).

ЛАБОРАТОРНА СТАНДАРТНА ОПЕРАЦІЙНА ПРОЦЕДУРА МЕРЕЖІ PULSENET ДЛЯ ПОВНОЇ ЕКСТРАКЦІЇ ДНК ТА КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ ОЧИЩЕНИХ ЕКСТРАКТІВ ДНК			
Документ PNL33	Ver. No. 02	Дата набуття чинності: 12/7/2021	13 Сторінка з 23

- 7.3.4.8. Після завершення початкового зчитування натисніть "Розрахувати концентрацію/Calculate Stock Concentration".
- 7.3.4.9. Виберіть об'єм зразка (1-20 мкл) на коліщатку об'єму і бажані одиниці виміру з випадаючого меню (натисніть на відображені одиниці виміру, щоб отримати підказку).

ПРИМІТКА: *Одиниці виміру можна перевести в нг/мкл (або інші одиниці), натиснувши кнопку, що відображає одиниці виміру (поруч із зчитаною концентрацією), і вибравши потрібну одиницю у спливаючому вікні (див. нижче).*

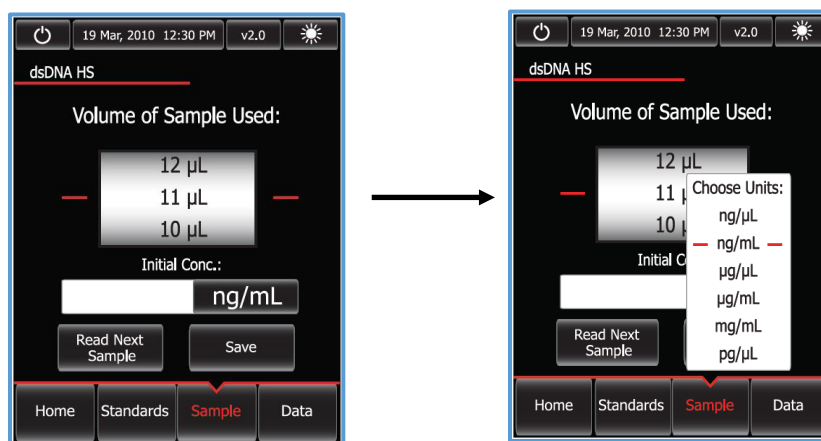


Рисунок 4: Скріншот роботи флуориметра Qubit 2.0 для вибору об'єму зразка і одиниць виміру.

- 7.3.4.10. Натисніть "Зберегти/Save". З'явиться індикатор виконання, який вказує на те, що відображені дані зберігаються в приладі.
ПРИМІТКА: *Кнопку "Зберегти" можна натискати кілька разів, не створюючи при цьому дублюючих записів.*
- 7.3.4.11. Перейдіть до зчитування наступного зразка, помінявши пробірки місцями, вибравши "Read Next Sample/Зчитати наступний зразок" і повторюючи кроки 7.3.4.7 - 7.3.4.10, поки не будуть зчитані всі зразки.
- 7.3.4.12. Коли всі зразки будуть зчитані, натисніть кнопку "Дані" в нижньому правому куті екрану.
- 7.3.4.13. Вставте накопичувач у відповідний слот. Виділіть показання для зразків, що вас цікавлять, і натисніть на іконку флеш-накопичувача в нижньому лівому кутку екрану, щоб передати дані. На екрані з'явиться індикатор виконання, який показуватиме стан процесу.
ПРИМІТКА: *Зелена крапка на піктограмі USB вказує на те, що прилад розпізнає накопичувач. Якщо накопичувач відсутній, вставлений неправильно або не може бути розпізнаний, замість нього з'явиться червона крапка.*
- 7.3.4.14. Вийміть накопичувач. Збережений файл .CSV тепер можна відкрити в Microsoft Excel на будь-якій комп'ютерній робочій станції.

ЛАБОРАТОРНА СТАНДАРТНА ОПЕРАЦІЙНА ПРОЦЕДУРА МЕРЕЖІ PULSENET ДЛЯ ПОВНОЇ ЕКСТРАКЦІЇ ДНК ТА КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ ОЧИЩЕНИХ ЕКСТРАКТИВ ДНК			
Документ PNL33	Ver. No. 02	Дата набуття чинності: 12/7/2021	14 Сторінка з 23

- 7.3.4.15. Зразки перераховані зверху вниз у порядку від останнього зчитування до першого.
- 7.3.4.16. Переіменуйте зразки відповідно. Назви зразків за замовчуванням у колонці "Назва" при відкритті файлу в Excel будуть відповідати часу зчитування кожного зразка.
- 7.3.4.17. Ці концентрації ДНК можуть бути записані у відповідні робочі книги підготовки бібліотеки ПГС.
НЕОБОВ'ЯЗКОВО: Концентрацію ДНК можна також записати замість використання накопичувача, в першу чергу для ситуацій, коли було кількісно визначено лише кілька зразків.
- 7.3.4.18. Ідеальна концентрація - ≥ 10 нг/мкл.
ПРИМІТКА: якщо концентрація ДНК низька, екстракт ДНК можна сконцентрувати за допомогою набору Zymo DNA Clean & Concentrator®-5 (інструкції див. у Додатку PNL33-2).

7.3.5. [™]Робота з флуориметром Qubit 3.0 і 4.0

- 7.3.5.1. Торкніться екрану, щоб активувати пристрій.
- 7.3.5.2. Коли з'явиться запит на вибір типу зразка, виберіть "dsDNA".
- 7.3.5.3. Коли з'явиться запит на вибір типу аналізу, виберіть "dsDNA Broad Range" або "dsDNA High Sensitivity" залежно від аналізу, який використовується.
- 7.3.5.4. Торкніться "зчитування стандартів/read standards".
- 7.3.5.5. У відповідь на запит вставте стандарт 1 і виберіть "зчитування стандарту 1".
- 7.3.5.6. У відповідь на підказку вставте стандарт 2 і виберіть "read standard 2" (читати стандарт 2).
ПРИМІТКА: Якщо прилад не може зчитати стандарти, почніть процес спочатку, підготувавши нові стандарти і зразки, дотримуючись інструкцій, викладених у кроках 7.3.3.
- 7.3.5.7. Виберіть "Запустити зразки/Run samples".
- 7.3.5.8. На екрані об'єму зразка виберіть об'єм зразка (1-20 мкл), торкаючись кнопок + або - на коліщатку.
[™]**ПРИМІТКА:** Якщо ви використовуєте Qubit 4, на головному екрані є опція, за допомогою якої можна розрахувати необхідний об'єм за допомогою "Qubit 1X dsDNA Assay Kits, широкий діапазон (BR)" (крок 6.1.11).

ЛАБОРАТОРНА СТАНДАРТНА ОПЕРАЦІЙНА ПРОЦЕДУРА МЕРЕЖІ PULSENET ДЛЯ ПОВНОЇ ЕКСТРАКЦІЇ ДНК ТА КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ ОЧИЩЕНИХ ЕКСТРАКТИВ ДНК			
Документ PNL33	Ver. No. 02	Дата набуття чинності: 12/7/2021	15 Сторінка з 23

7.3.5.9. Виберіть одиниці виміру концентрації вихідного зразка у меню.

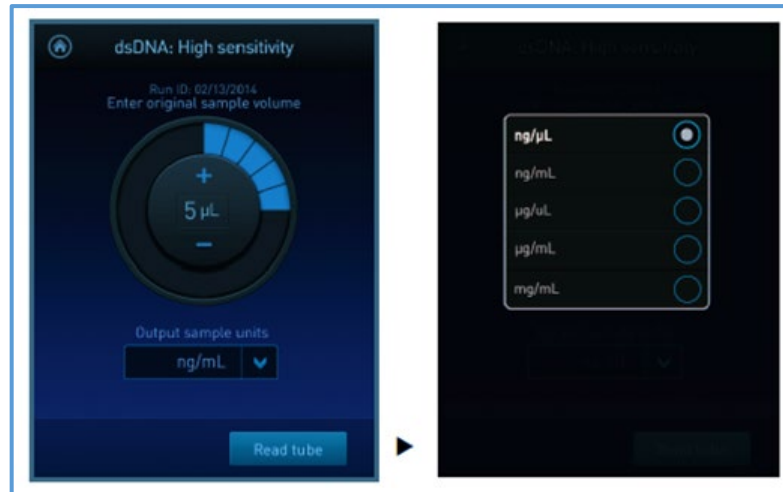


Рисунок 5: Знімок екрана роботи флуориметра Qubit 3.0 або 4.0 для вибору об'єму зразка і одиниць виміру.

- 7.3.5.10. Вставте пробірку зі зразком в камеру для зразків, закрийте кришку і виберіть "Зчитати пробірку".
- 7.3.5.11. Перейдіть до наступного зразка і повторіть крок 7.3.5.10, поки не будуть зчитані всі зразки.
- 7.3.5.12. Виберіть "Data" (Дані).
ПРИМІТКА: Синій шеврон над номером зразка змінює порядок введення даних.
- 7.3.5.13. Вставте накопичувач у відповідний слот і натисніть "Експорт".
- 7.3.5.14. Виберіть аналіз, який потрібно експортувати на накопичувач.
ПРИМІТКА: На екрані відобразяться всі аналізи, які були збережені на приладі, в хронологічному порядку, найновіший буде вгорі.
- 7.3.5.15. Виберіть "Експортувати".
ПРИМІТКА: На екрані даних експорту відображається кількість успішних зразків, збережених на накопичувачі.
- 7.3.5.16. Натисніть "Готово".
- 7.3.5.17. Торкніться піктограми домашнього екрана.
- 7.3.5.18. Вийміть накопичувач. Збережений файл .CSV тепер можна відкрити в Microsoft Excel на будь-якій робочій станції.
- 7.3.5.19. Зразки перераховані зверху вниз у порядку від останнього прочитаного до першого прочитаного.
- 7.3.5.20. Переіменуйте зразки відповідно. Назви зразків за замовчуванням у колонці "Назва" при відкритті файлу в Excel будуть відповідати часу зчитування кожного зразка.
- 7.3.5.21. Ці концентрації ДНК можуть бути записані у відповідні робочі книги підготовки бібліотеки ПГС.

ЛАБОРАТОРНА СТАНДАРТНА ОПЕРАЦІЙНА ПРОЦЕДУРА МЕРЕЖІ PULSENET ДЛЯ ПОВНОЇ ЕКСТРАКЦІЇ ДНК ТА КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ ОЧИЩЕНИХ ЕКСТРАКТІВ ДНК			
Документ PNL33	Ver. No. 02	Дата набуття чинності: 12/7/2021	16 Сторінка з 23

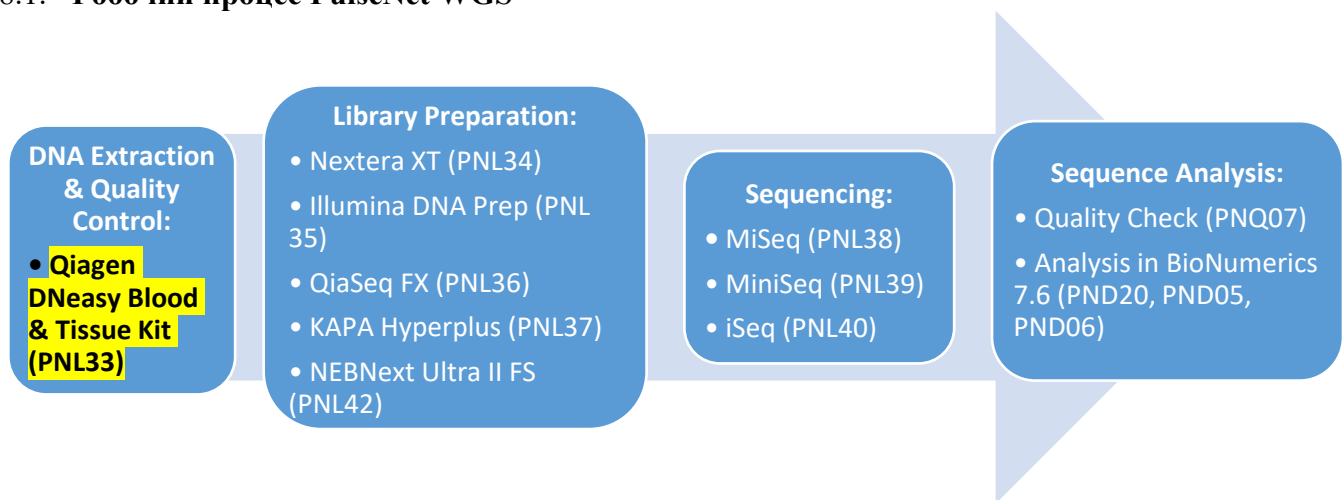
НЕОБОВ'ЯЗКОВО: Концентрацію ДНК можна також записати замість використання накопичувача, в першу чергу для ситуацій, коли було кількісно визначено лише кілька зразків.

7.3.5.22. Ідеальна концентрація - ≥ 10 нг/мкл.

ПРИМІТКА: якщо концентрація ДНК низька, екстракт ДНК можна сконцентрувати за допомогою набору Zymo DNA Clean & Concentrator®-5 (інструкції див. у Додатку PNL33-2).

8. БЛОК-СХЕМИ:

8.1. Робочий процес PulseNet WGS



8.2. Виділення ДНК за допомогою набору Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kit



ЛАБОРАТОРНА СТАНДАРТНА ОПЕРАЦІЙНА ПРОЦЕДУРА МЕРЕЖІ PULSENET ДЛЯ ПОВНОЇ ЕКСТРАКЦІЇ ДНК ТА КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ ОЧИЩЕНИХ ЕКСТРАКТИВ ДНК			
Документ PNL33	Ver. No. 02	Дата набуття чинності: 12/7/2021	17 Сторінка з 23

9. ПОВ'ЯЗАНІ ДОКУМЕНТИ:

Номер документа	Назва
PNL34	Nextera XT Library Prep SOP
PNL34.W1	Робочий зошит з підготовки бібліотеки Nextera XT
PNL35	Illumina DNA Prep (DNA Flex) SOP
PNL35.W1	Робочий зошит для підготовки ДНК Illumina, 96 CD/UD індексів
PNL35.W2	Робочий зошит для підготовки ДНК Illumina, 24 CD-індекси
PNL35.W3	Робочий зошит з контрольним списком для підготовки ДНК Illumina
PNL36	QIAseq FX Library Prep SOP
PNL36.W1	Робочий зошит з підготовки бібліотеки QIAseq FX
PNL37	KAPA HyperPlus Library Prep SOP
PNL37.W1	Робочий посібник з підготовки бібліотеки KAPA HyperPlus
PNL42	NEB Next Ultra II FS Library Prep SOP
PNL42.W1	Робочий зошит з підготовки до роботи з бібліотекою NEB Next Ultra II FS
PNL38	Секвенування на MiSeq SOP
PNL39	Секвенування на MiniSeq SOP
PNL40	Секвенування на iSeq SOP
PNQ07	Illumina Sequence Data QC SOP
PND20	Робочий процес бази даних RefID BioNumerics SOP
PND05	Робочий процес бази даних BioNumerics Organism-Specific Database Workflow SOP

10. ВИКОРИСТАНА ЛІТЕРАТУРА

- 10.1. DNeasy Blood & Tissue Handbook. Qiagen.
<https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=68f29296-5a9f-40fa-8b3d-1c148d0b3030&lang=en>
- 10.2. Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit Technical Manual. Promega Corporation.
https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/0/wizard-genomic-dna-purification-kit-protocol.pdf?sc_lang=en?la=en.
- 10.3. DNA Clean and Concentrator[®]-5 Technical Manual. Zymo Research.
https://files.zymoresearch.com/protocols/_d4003t_d4003_d4004_d4013_d4014_dna_clean_concentrator_-5.pdf.
- 10.4. NanoDrop[™] 2000/2000c Spectrophotometers – User Manual. ThermoFisher Scientific.
<https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2Fassets%2FCAD%2Fmanuals%2FNanoDrop-2000-User-Manual-EN.pdf&title=TmFub0Ryb3AgMjAwMCAwYyBTcGVjdHJvcGhvdG9tZXRIcnMgLSBVc2VyIE1hbnVhbA==>

ЛАБОРАТОРНА СТАНДАРТНА ОПЕРАЦІЙНА ПРОЦЕДУРА МЕРЕЖІ PULSENET ДЛЯ ПОВНОЇ ЕКСТРАКЦІЇ ДНК ТА КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ ОЧИЩЕНИХ ЕКСТРАКТИВ ДНК			
Документ PNL33	Ver. No. 02	Дата набуття чинності: 12/7/2021	18 Сторінка з 23

- 10.5. NanoDrop™ One with NanoDrop QC Software – User Guide. ThermoFisher Scientific.
<https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FMSD%2Fmanuals%2Fnanodrop-qc-user-guide-EN.pdf&title=VXNlciBHdWlkZTogTmFub0Ryb3AgUUMgU3BIY3Ryb3Bob3RvbWV0ZXI>
- 10.6. User Guide – Cubit™ 3 Fluorometer. ThermoFisher Scientific.
https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FBID%2Fmanuals%2FMAN0010866_Qubit_3_Fluorometer_UG.pdf&title=VXNlciBHdWlkZTogUXViaXQgMyBGbHVvcn9tZXRlcg==
- 10.7. User Guide – Cubit™ 4 Fluorometer. ThermoFisher Scientific.
https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2FMAN0017209_Qubit_4_Fluorometer_UG.pdf&title=VXNlciBHdWlkZTogUXViaXQgNCBGBHVvcn9tZXRlcg==

11. КОНТАКТИ:

- 11.1. PulseNet NGS Lab:
pulsenetngslab@cdc.gov

12. ЗМІНИ:

- 12.1. **01/24/2019:**
- Вилучено процедури екстракції та контролю якості ДНК з PNL32 та створено окремий документ (PNL33).
- 12.2. **12/01/2021**
- Оновлені каталожні номери та контакти
 - Додані інструкції для Cubit™ 4
 - Додані блок-схеми, супутні документи та посилання

13. ПІДПИСИ ЗАТВЕРДЖЕННЯ:

Затверджено _____ Дата: _____
 Персонал PulseNet з ЗЯ/КЯ

Затверджено: Затверджено _____ Відсутній _____ Дата: _____
 Керівник відділу виявлення спалахів та епіднагляду PulseNet

Затверджено _____ Дата: _____
 Керівник відділу методів субтипуювання

Затверджено _____ Дата: _____
 Керівник групи епіднагляду за спалахами PulseNet Reference

ЛАБОРАТОРНА СТАНДАРТНА ОПЕРАЦІЙНА ПРОЦЕДУРА МЕРЕЖІ PULSENET ДЛЯ ПОВНОЇ ЕКСТРАКЦІЇ ДНК ТА КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ ОЧИЩЕНИХ ЕКСТРАКТИВ ДНК			
Документ PNL33	Ver. No. 02	Дата набуття чинності: 12/7/2021	19 Сторінка з 23

Додаток PNL33-1

®Виділення ДНК за допомогою набору для очищення геномної ДНК Promega Wizard

1. Процедура

1.1. Підготовка ізоляту

1.1.1. Заштрихуйте виділену колонію з тест-культур на планшет TSA-SB (або аналогічні середовища). Інкубуйте культури при 37-42°C ± 1 протягом 16-24 годин.

ПРИМІТКА: Якщо ви використовуєте культуру з бульйону, див. крок 1.2.1.1.2. для грамнегативних бактерій і крок 1.2.2.3.2. для грампозитивних бактерій.

1.2. Виділення ДНК

1.2.1. Лізис клітин для грамнегативних бактерій

1.2.1.1. Зберіть культуру бактерій:

1.2.1.1.1. Посівний матеріал:

1.2.1.1.1.1. Розподіліть 600 мкл розчину для нуклеїнового лізису в стерильні мікропробірки об'ємом 1,5 мл.

1.2.1.1.1.2. Заповніть 10-мілілітрову петлю для посіву приблизно на одну четверту частину культурою і додайте до розчину нуклеїнового лізису.

1.2.1.1.2. Бульйонна культура:

1.2.1.1.2.1. Додайте 1 мл бульйонної культури в 1,5 мл мікроцентрифужну пробірку.

1.2.1.1.2.2. Центрифугуйте при 13 000-14 000 x g (10 000-11 000 об/хв), щоб осадити клітини. Видаліть і викиньте якомога більше надосадової рідини, не перемішуючи клітини.

1.2.1.1.2.3. Ресуспендуйте в 600 мкл розчину для лізису ядер.

1.2.1.2. Перемішайте вортексом протягом 5-10 секунд або піпетуванням вгору-вниз, доки розчин не стане гомогенним.

1.2.1.3. °Інкубуйте зразок при 80 C ± 1 протягом 5 хвилин для лізису клітин.

°**НЕОБОВ'ЯЗКОВО:** Інкубація при 60 C ± 1 протягом 45 хвилин (замість 80C ± 1 протягом 5 хвилин) може покращити лізис клітин.

1.2.1.4. Охолодіть зразок, інкубуючи на льоду протягом 1 хвилини або на столі протягом 5 хвилин.

1.2.1.5. Додайте 3 мкл розчину РНКазі А до клітинного лізату і перемішайте, перевертаючи пробірку 25 разів.

1.2.1.6. °Інкубують при 37 C ± 1 протягом 15-60 хвилин.

1.2.2. Лізис клітин для грампозитивних бактерій

1.2.2.1. Розведіть достатню кількість 50 мМ ЕДТК, рН 8,0 для кількості екстракцій, що виконуються.

1.2.2.1.1. 50 ммоль ЕДТК, рН 8,0 = 100 мкл вихідного розчину 0,5 М ЕДТК + 900 мкл молекулярної води. Перемішати, перевертаючи кілька разів, і зберігати при кімнатній температурі (15-30°C).

ЛАБОРАТОРНА СТАНДАРТНА ОПЕРАЦІЙНА ПРОЦЕДУРА МЕРЕЖІ PULSENET ДЛЯ ПОВНОЇ ЕКСТРАКЦІЇ ДНК ТА КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ ОЧИЩЕНИХ ЕКСТРАКТИВ ДНК			
Документ PNL33	Ver. No. 02	Дата набуття чинності: 12/7/2021	20 Сторінка з 23

- 1.2.2.2. Приготуйте достатню кількість 20 мг/мл розчину лізоциму (розчин літичного ферменту), додавши порошок лізоїму до 50 ммоль ЕДТК, рН 8,0, згідно з наведеною нижче таблицею.

ПРИМІТКА: Повне розчинення лізоциму в розчині може зайняти до 10 хв.

Кількість зразків + 1	Загальний об'єм 50 ммоль ЕДТК (мкл)	Лізоцим (мг)
5 + 1 = 6	1080	21.6
10 + 1 = 11	1980	39.6
18 + 1 = 19	3420	68.4
20 + 1 = 21	3780	75.6

Таблиця 1: Об'єм ЕДТК та лізоциму, необхідний для приготування розчину літичного ферменту для різної кількості зразків.

- 1.2.2.3. Зберіть культуру бактерій:

- 1.2.2.3.1. Посівна культура:

1.2.2.3.1.1. Розподіліть 420 мкл 50 ммоль ЕДТК, рН 8,0 у стерильні мікропробірки об'ємом 1,5 мл

1.2.2.3.1.2. Заповніть 10 мкл посівної петлі приблизно на одну четверту частину культурою і додайте до 50 ммоль ЕДТК.

- 1.2.2.3.2. Бульйонна культура:

1.2.2.3.2.1. Додайте 1 мл бульйонної культури в 1,5 мл мікроцентрифужну пробірку.

1.2.2.3.2.2. Центрифугуйте при 13 000-14 000 x g (10 000-11 000 об/хв), щоб осадити клітини. Видаліть і викиньте якомога більше надосадової рідини.

1.2.2.3.2.3. Ресуспендуйте клітини в 420 мкл 50 ммоль ЕДТК, рН 8,0.

- 1.2.2.4. Обережно піпетуйте та/або вортексуйте, поки клітини не будуть ресуспендовані.
- 1.2.2.5. Додайте 180 мкл розчину літичного ферменту до кожного зразка і перемішайте вортексом.
- 1.2.2.6. Інкубуйте зразок при 56°C ± 1 протягом 60 хвилин для лізису зовнішньої клітинної стінки.
- 1.2.2.7. Центрифугуйте зразок при 13 000-16 000 x g (10 000-11 000 об/хв) протягом 1 хвилини. Видаліть і позбавтеся якомога більше надосадової рідини.
- 1.2.2.8. Додайте 600 мкл розчину для лізису ядер. Обережно піпетуйте вгору-вниз, доки клітини не стануть суспендованими.
- 1.2.2.9. Інкубуйте при 60°C ± 1 протягом 45 хвилин для лізису клітин.
- 1.2.2.10. Охолодіть зразок, інкубуючи на льоду протягом 1 хвилини або на термостаті протягом 5 хвилин.
- 1.2.2.11. Додайте 3 мкл розчину РНКазу А, 4 мг/мл, до клітинного лізату і перемішайте, перевертаючи пробірку 25 разів.

ЛАБОРАТОРНА СТАНДАРТНА ОПЕРАЦІЙНА ПРОЦЕДУРА МЕРЕЖІ PULSENET ДЛЯ ПОВНОЇ ЕКСТРАКЦІЇ ДНК ТА КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ ОЧИЩЕНИХ ЕКСТРАКТИВ ДНК			
Документ PNL33	Ver. No. 02	Дата набуття чинності: 12/7/2021	21 Сторінка з 23

1.2.2.12. Інкубують при $37\text{ C} \pm 1$ протягом 30-90 хвилин.

1.2.3. Осадження білка

- 1.2.3.1. Охолодіть зразок, помістивши його на лід на 1 хвилину або на термостат на 5 хвилин.
- 1.2.3.2. Додайте 200 мкл розчину для осадження білка до обробленого РНКазою клітинного лізату.
- 1.2.3.3. Інтенсивно змішайте на вортексі на високій швидкості протягом 20 секунд для перемішування.
- 1.2.3.4. Інкубуйте зразок на льоду протягом 10 хвилин.
- 1.2.3.5. Центрифугуйте при 13 000-16 000 x g (10 000-13 000 об/хв) протягом 3 хвилин. Осаджений білок повинен утворити щільну гранулу.
НЕОБОВ'ЯЗКОВО: *Якщо білок не утворив щільну гранулу, повторіть вищезазначені кроки, переливши надосадову рідину, що містить ДНК (залишивши осаджену білкову гранулу), в чисту мікроцентрифужну пробірку об'ємом 1,5 мл, інкубуючи зразок на льоду протягом 5 хвилин і центрифугуючи при 13 000-16 000 x g або 10 000 - 13 000 об/хв протягом 3 хвилин.*

1.2.4. Осадження ДНК

- 1.2.4.1. Перенесіть надосадову рідину, що містить ДНК, в чисту 1,5 мл мікропробірку, що містить 600 мкл 100% ізопропанолу (2-пропанолу).
- 1.2.4.2. Перемішайте зразок, обережно перевертаючи приблизно 50 разів.
- 1.2.4.3. Центрифугуйте при 13 000-16 000 x g (10 000-13 000 об/хв) протягом 3 хвилин. Гранули ДНК повинні бути видимими у вигляді невеликих білих пелет.
- 1.2.4.4. Злийте надосадову рідину. Гранула може бути нещільною, тому виливайте повільно, щоб не порушити її цілісність.
- 1.2.4.5. Додайте 600 мкл 70% етанолу і переверніть пробірку кілька разів, щоб омийти осад.
 - 1.2.4.5.1. Приготувати 70% етанол:

Реагент	Об'єм на зразок	Приклад: 20 зразків
100% етанол	0,42 мл	8,4 мл
Молекулярна вода	0,18 мл	3.6 мл

Таблиця 2. Об'єми реагентів на зразок для 70% етанолу

- 1.2.4.6. Центрифугуйте при 13 000-16 000 x g (10 000-13 000 об/хв) протягом 1-3 хвилин. Обережно злийте етанол. Виливайте повільно, оскільки гранули можуть бути нещільними.
- 1.2.4.7. Коротко прокрутіть пробірку, щоб зібрати залишки етанолу на дні пробірки. Видаліть залишки етанолу за допомогою піпетки.
- 1.2.4.8. Переверніть пробірку і злийте рідину на чистий абсорбуючий папір. Дайте пробірці висохнути на повітрі протягом 10-15 хвилин.

ЛАБОРАТОРНА СТАНДАРТНА ОПЕРАЦІЙНА ПРОЦЕДУРА МЕРЕЖІ PULSENET ДЛЯ ПОВНОЇ ЕКСТРАКЦІЇ ДНК ТА КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ ОЧИЩЕНИХ ЕКСТРАКТИВ ДНК			
Документ PNL33	Ver. No. 02	Дата набуття чинності: 12/7/2021	22 Сторінка з 23

1.2.5. Гідратація ДНК

- 1.2.5.1. Додайте 50-100 мкл 10 ммоль трис-НСІ, рН 8,0. Проведіть піпеткою вгору-вниз, щоб змістити гранули ДНК з дна та/або стінок пробірки. ДНК може утворювати дифузний осад вздовж стінки пробірки.
НЕОБОВ'ЯЗКОВО: Аліквоту 10 ммоль трис-НСІ, рН 8,0 можна короткочасно прогріти (приблизно 1-2 хвилини) на водяній бані при $65^{\circ}\text{C} \pm 1$, щоб полегшити регідратацію ДНК.
- 1.2.5.2. Регідратуйте ДНК, інкубуючи зразок протягом 1 години при $65^{\circ}\text{C} \pm 1$ і/або протягом ночі при кімнатній температурі або $2-8^{(o)}\text{C}$. Періодичне постукування по пробірці допоможе диспергувати ДНК.
НЕОБОВ'ЯЗКОВО: короткочасно покрутіть пробірку на вортексі, щоб зібрати зразок на дні пробірки.
ПРИМІТКА: Зберігайте екстракти ДНК при температурі $2-8^{\circ}\text{C}$ для короткострокового зберігання або при температурі від -80°C до -15°C для довгострокового зберігання (≥ 7 днів).

ЛАБОРАТОРНА СТАНДАРТНА ОПЕРАЦІЙНА ПРОЦЕДУРА МЕРЕЖІ PULSENET ДЛЯ ПОВНОЇ ЕКСТРАКЦІЇ ДНК ТА КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ ОЧИЩЕНИХ ЕКСТРАКТИВ ДНК			
Документ PNL33	Ver. No. 02	Дата набуття чинності: 12/7/2021	23 Сторінка з 23

Додаток PNL33-2

®Процедура використання набору Zymo DNA Clean & Concentrator -5

1. Перед початком роботи:

- 1.1. Для 25 пробірки: Додайте 24 мл 100% етанолу (26 мл 95% етанолу) до 6 мл концентрату буфера для промивання ДНК.
- 1.2. Для набору 200: Додайте 96 мл 100% етанолу (104 мл 95% етанолу) до 24 мл концентрату буфера для промивання ДНК.

2. Виконайте процедуру:

ПРИМІТКА: *Всі етапи центрифугування слід виконувати в діапазоні 10 000 - 16 000 x g (9 000 - 11 500 об/хв).*

- 2.1. У мікроцентрифужну пробірку об'ємом 1,5 мл додайте 2-5 об'ємів буфера для зв'язування ДНК ChIP до кожного об'єму зразка ДНК (див. Таблицю 1 нижче). Ретельно перемішайте.

Застосування	Буфер для зв'язування ДНК: Зразок	Приклад
Плазмідна, геномна ДНК (2 кб)	2 : 1	200 мкл : 100 мкл
Продукт ПЛР, фрагмент ДНК	5 : 1	500 мкл : 100 мкл

Таблиця 1: Рекомендоване співвідношення буфера для зв'язування ДНК до зразка.

- 2.2. Перенесіть цю суміш у колонку Zymo-Spin¹ в пробірці для збору зразків.
- 2.3. Центрифугуйте протягом 30 секунд і викиньте проточну частину.
- 2.4. Додайте 200 мкл буфера для промивання ДНК в колонку. Процентрифугуйте 1 хвилину і повторіть етап промивання.
- 2.5. Додайте 20 мкл 10 ммоль трис-НСІ рН 8,0 безпосередньо в матрицю колонки (не торкайтеся фільтра кінчиком піпетки).
- 2.6. Інкубуйте при кімнатній температурі протягом однієї хвилини.
- 2.7. Перенесіть колонку в мікроцентрифужну пробірку на 1,5 мл і центрифугуйте протягом 30 секунд для елюювання ДНК.
- 2.8. Повторіть кроки 2.5 - 2.7 елюювання в тій самій мікроцентрифузі, щоб отримати кінцевий об'єм зразка ДНК 40 мкл.
- 2.9. Тепер ДНК готова до кількісного визначення з подальшим використанням відповідного методу підготовки бібліотеки.

¹Ємність колонки для зразків становить 800 мкл. Якщо об'єм зразка перевищує 800 мкл, може знадобитися завантажити і прокрутити колонку кілька разів.