

Secvențiere long reads și analiza prin secvențiere a plasmidelor -ghid de proceduri-

Extractia si purificarea plasmidelor

Este importanta selectarea unei metode de extracție care va elimina efectiv contaminanți - cum ar fi detergenți, denaturanți, chelatori agenți sau concentrații mari de sare - si care va asigura probe de ADN de calitate in vederea pregătirii bibliotecii de secvențiere.

Este recomandata utilizarea unui mini kit de pregătire pentru plasmide, cum ar fi VWR Plasmid Miniprep Kit II, care permite extragerea de fiabile cantități de ADN de înaltă puritate din culturi; se pot realiza până la 200 de probe.

Pentru fiecare probă, sunt apoi necesare 400 ng de ADN plasmidic preluat în pregătirea probei.

Este recomandata utilizarea Fluorometru lui Qubit pentru cuantificare precisă a ADN

Pregatirea bibliotecii de secvențiere

Pentru a vă pregăti biblioteca pentru secvențiere și analiză în aval, se pot alege dintre Kitul 24- sau 96-plex Rapid Barcoding. Aceste Kituri fără PCR utilizează o transpozaza pentru a fragmenta și atașa coduri de bare la ADN-ul plasmidic înainte de a adăuga adaptorii de secvențiere.

Pentru performanțe îmbunătățite de secvențiere, o curățare pe bază a bibliotecii poate fi realizată și cu soluții precum Agencourt AMPure XP. Deși nu este o cerință, o curățare va îmbunătăți eficiența secvențierii, furnizând mai multe date într-un interval de timp mai scurt.

Prin multiplexarea unui număr de probe pe un singur MinION Flow Cell, costul per probă poate fi redus considerabil. Celulele de flux pot fi, de asemenea, spălate și reutilizate, reducând și mai mult costul pe probă.

Secvențierea propriu-zisa

Recomandăm secvențierea bibliotecilor de plasmide pe MinION Flow Cells, care pot fi utilizate pe dispozitivele portabile MinION pentru secvențiere de rutină, ușor accesibilă.

Pentru procesarea unui număr mai mare de probe în mod constant, dispozitivul de laborator GridION permite secvențierea la cerere a până la cinci flow cells simultan.

Fluxul de lucru pentru analiza validării clonelor poate genera o secvență consensuală a plasmidei utilizând modele de basecalling rapid, de înaltă acuratețe sau super-acuratețe. Timpul de rulare va



depinde de numărul de probe și de lungimea plasmidelor, dar sunt necesare doar aproximativ 2.500 de citiri per plasmid pentru a obține rezultate cu un nivel ridicat de încredere; pentru o rulare 96-plex de plasmide de aproximativ 5 kb, acest lucru poate fi realizat în mai puțin de două ore.

Celulele de flux pot fi reutilizate după îndepărtarea bibliotecii utilizând Flow Cell Wash Kit.

Analiza rezultatelor

Asamblarea și anotarea plasmidelor dumneavoastră se realizează folosind fluxul de lucru wf-clone-validation. Fluxul de lucru wf-clone-validation — o soluție EPI2ME — integrează o serie de instrumente de bune practici pentru asamblarea și anotarea plasmidelor într-un pipeline de analiză ușor de utilizat, inclusiv Flye pentru asamblarea plasmidelor, Tricycler pentru circularizarea și rafinarea asamblării, Medaka pentru lustruirea secvențelor și pLannotate pentru adnotare.

Raportul generat de acest flux de lucru vă prezintă promotori, operatori, gene codificatoare de proteine și altele, codificate prin culori în funcție de baza de date din care au fost identificate.