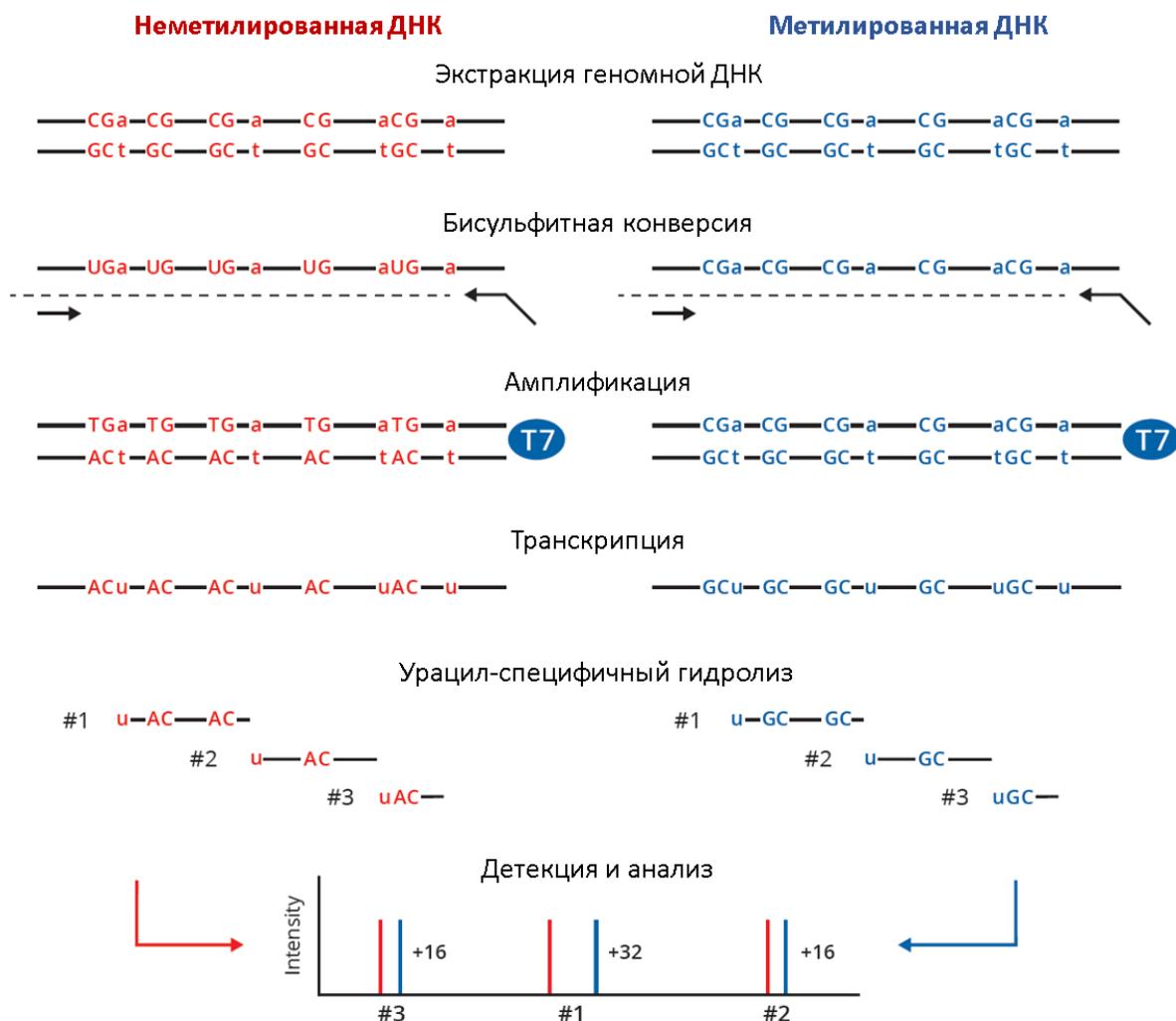


## Оценка уровня метилирования набором MassCLEAVE

Данная методика позволяет выявлять сайты метилирования, а также количественно оценить степень метилирования интересующего участка ДНК.

В одной лунке с MassCLEAVE можно посмотреть уровень только одной области (=одного ампликона длиной 200-500 п.о.). Соответственно на спектре отображаются массы фрагментов, на которые порежется ампликон.

В процессе бисульфитной обработки цитозин конвертируется в урацил, при этом метилированный цитозин остается неизменным. В результате амплификации конвертированной ДНК получатся двуцепочечная ДНК, в прямой цепи которой на месте метилированных цитозинов остаются цитозины, а на месте неметилированных присоединяются тимины. На этапе транскрипции синтезируется одноцепочечная последовательность (РНК), соответствующая обратной цепи ДНК, в которой метилированным цитозинам соответствуют гуанины, а неметилированным – аденины. В процессе урацил-специфичного гидролиза цепочки разрезаются на фрагменты, масса которых детектируется и анализируется программным обеспечением EpiTYPER (рис. 1).



\* Строчными буквами для наглядности обозначены позиции нуклеотидов, по которым идет урацил-специфичный гидролиз.

**Рисунок 1.** Общая схема процесса пробоподготовки от образца до анализа.

## 1. Дизайн праймеров

### 1.1. Подбор праймеров в ПО EpiDesigner

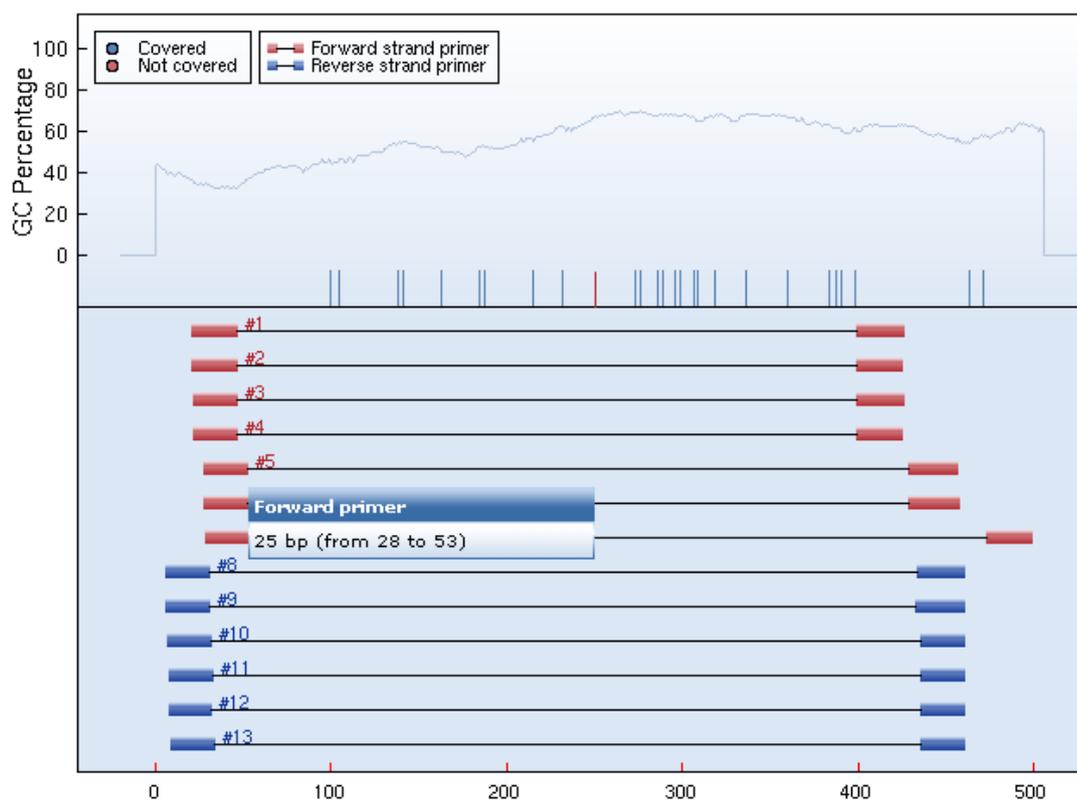
**Рисунок 2.** Окно ввода данных и параметров программного обеспечения EpiDesigner для подбора праймеров для оценки степени метилирования ДНК.

**Таблица 1.** Описание параметров подбора праймеров в ПО EpiDesigner.

Параметр	Комментарий
Paste Sequence	Нуклеотидная последовательность участка для анализа.
Primer Tm	Температура плавления праймеров. Лучше подбирать максимально высокую допустимую температуру.
Primer Size	Длина праймера в парах оснований (п.о.).
Product Size	Длина ампликона в парах оснований (п.о.). Для ДНК, выделенной из парафиновых блоков, лучше указывать длину не более 200 п.о. Для ДНК, выделенной из крови – 500 п.о.
Product CPGs	Минимальное количество CpG в анализируемом фрагменте.
Primer non-CPG 'C's	Допустимое количество не CpG цитозинов в области посадки праймера.
Maximize Coverage	Увеличить покрытие. Поставить галочку для подбора максимального количества вариантов праймеров.
Primer Poly X	Максимальное количество повторяющихся нуклеотидов A/C/G в нуклеотидной последовательности праймера. Чем меньше количество повторов, тем выше специфичность праймера.
Primer Poly T	Максимальное количество повторяющихся тиминов в нуклеотидной последовательности праймера.
Target *	Целевой участок последовательности, не превышающего по длине максимальный размер ампликона.
Excluded Regions *	Участок последовательности, который можно исключить и не использовать для подбора праймеров (например, тандемные повторы).
Transcription Region *	Участок последовательности, в котором начинается транскрипция.
Select Strand	Выбирать «both» (обе цепи).

Number of output primers	Количество вариантов праймеров. Для активации окна ввода необходимо убрать галочку из графы «Maximize Coverage».
Mass Window	Диапазон масс анализируемых фрагментов. Рекомендуется оставить 1500-7000 (по умолчанию).
Analyze CpGs in C Reaction	Убрать галочку, так как C-cleave химия больше не продается.
Analyze CpGs in T Reaction	Поставить галочку, так как используются реагенты T-cleave.
Notes *	Заметки.

\* Опциональные параметры, поля можно оставлять не заполненными.

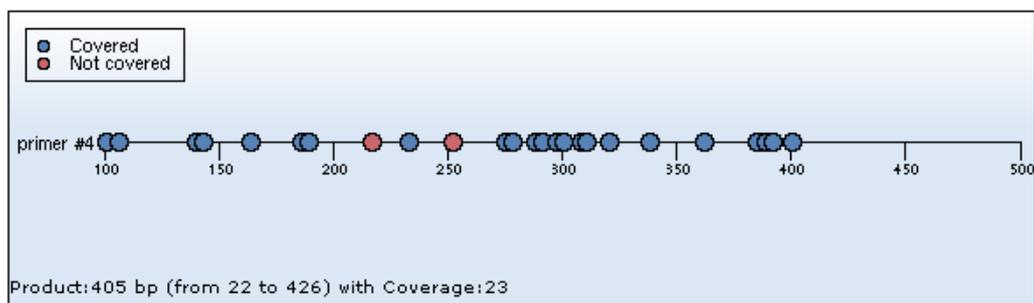


**Рисунок 3.** Карта-схема посадки праймеров для анализа CpG-островков в анализируемой последовательности.

По оси X обозначена длина сиквенса в парах оснований; по оси Y – процент GC в исследуемой последовательности.

Вертикальными линиями в верхней части схемы отмечено расположение CpG в сиквенсе. Синими вертикальными линиями обозначены CpG, которые можно исследовать помощью реакции MassCLEAVE, а красными – CpG, которые проанализировать нельзя.

Горизонтальные красные и синие линии с порядковыми номерами отображают варианты и места посадки пар праймеров, а также длину ампликонов. Красным обозначены праймеры с посадкой на прямую цепь ДНК, а синим – на обратную цепь. При наведении курсора на один из вариантов ампликонов (чёрную горизонтальную линию), на схеме отображается расположение CpG в ампликоне (см. рис. 3). При наведении курсора на праймер – отображается длина праймера и его расположение (см. рис. 2).



**Рисунок 4.** Схема расположения CpG в ампликоне. Внизу схемы указана длина ампликона в парах оснований с количеством CpG, которые можно проанализировать с использованием этой пары праймеров. В скобках указано расположение ампликона на исходной последовательности.

CpG Islands
Total number of CpG islands found = 1
Start = 101 End = 474 GC = 61.23 OE = 0.780

**Рисунок 5.** Информация по найденным в анализируемой последовательности CpG-островкам. Где «Total number of CpG islands found» – общее количество найденных CpG островков; «Start» – номер нуклеотида, с которого начинается CpG-островок; «End» – номер нуклеотида, которым заканчивается CpG-островок; «GC» – процентное содержание GC оснований в исследуемой последовательности; «OE<sup>1</sup>» – плотность CpG.

<sup>1</sup> OE = число CpG / (число C x число G) x длина фрагмента в нуклеотидах (observed to expected).

<input type="checkbox"/>	Primer	Start	Size	Tm	GC%	C's	Sequence
<input checked="" type="checkbox"/>	1 LEFT PRIMER	21	26	59.87	27	6	TTTTAGTGTTTGGGAAGAAATTGTTG
	RIGHT PRIMER	427	27	59.57	33	6	AAACAATTTAAATAACTACCTCCTCCC
	PRODUCT Size: 407, No of CpG's : 25, Coverage : 23						
<input type="checkbox"/>	2 LEFT PRIMER	21	26	59.87	27	6	TTTTAGTGTTTGGGAAGAAATTGTTG
	RIGHT PRIMER	426	26	58.53	35	6	AACAATTTAAATAACTACCTCCTCCC
	PRODUCT Size: 406, No of CpG's : 25, Coverage : 23						
<input checked="" type="checkbox"/>	3 LEFT PRIMER	22	25	58.75	28	5	TTTTAGTGTTTGGGAAGAAATTGTTG
	RIGHT PRIMER	427	27	59.57	33	6	AAACAATTTAAATAACTACCTCCTCCC
	PRODUCT Size: 406, No of CpG's : 25, Coverage : 23						
<input type="checkbox"/>	13 LEFT PRIMER	461	25	60.66	32	8	GGAATTTGGGTTGTTTGGATTAGTT
	RIGHT PRIMER	9	25	56.85	36	4	TCCTATCTCTTCTCCCAATATCTA
	PRODUCT Size: 453, No of CpG's : 25, Coverage : 21						

Format: Database ▾
Export To File
Save Primers

Database  
Order  
Summary  
Detailed

**Рисунок 6.** Перечень возможных пар праймеров для наработки ампликонов, предложенный программным обеспечением на основании введенной последовательности.

Синим шрифтом указан размер ампликона (PRODUCT Size), общее количество CpG, попадающее в данный фрагмент (No of CpG's), а также количество CpG, которое можно проанализировать (Coverage).

### 1.2. Создание файла «Database» для импорта в EpiTyper

Для создания файла для импорта в программное обеспечение EpiTyper в графе «Format» необходимо выбрать опцию «Database» и нажать кнопку «Export To File». Файл с информацией (output.csv) автоматически сохранится в папку загрузок. Файл представляет из себя таблицу со следующими данными:

**Таблица 2.** Описание файла «Database» необходимого для импорта в ПО EpiTyper.

AmpliconName	Description	LPL	RPL	targetSequence
Название фрагмента	Описание (длина ампликона и количество CpG)	Длина левого праймера в п.о.	Длина правого праймера в п.о.	Нуклеотидная последовательность ампликона

### 1.3. Заказ праймеров

Для создания файла для заказа праймеров в графе «Format» необходимо выбрать опцию «Order» и нажать кнопку «Export To File». Файл с информацией (output.csv) автоматически сохранится в папку загрузок.

**Таблица 3.** Описание файла «Order» необходимого для заказа праймеров.

Sequence Description	Sequence
Название прямого праймера 1	Нуклеотидная последовательность прямого праймера 1
Название обратного праймера 1	Нуклеотидная последовательность обратного праймера 1
Название прямого праймера 2	Нуклеотидная последовательность прямого праймера 2
...	...

Нуклеотидные последовательности обратных праймеров в файле для заказа уже содержат последовательность T7-промотора, а также дополнительные 10-ти нуклеотидные «хвосты» для увеличения массы праймеров (отмечены строчными буквами).

**Таблица 4.** Образец содержания файла «Order» необходимого для заказа праймеров.

Sequence Description	Sequence
000_seq00001_000_10F	aggaagagagTTTTAGTGTTTGAAGAAATTGTTG
000_seq00001_000_T7R	cagtaatacgactcactatagggagaaggctAAACAATTTAAATAACTACCTC

Обратный праймер для ПЦР необходимо заказывать с T7-промотором, так как он необходим для этапа транскрипции. В случае подбора новых праймеров лучше заказывать несколько пар праймеров на один интересующий регион, для обеспечения возможности выбора наиболее оптимально работающего дизайна.

При заказе праймеров в заявке необходимо дополнительно отметить, что требуется высокая степень очистки (не ниже PAGE), чтобы быть уверенными в чистоте и правильности синтеза праймеров. Если праймеры были плохо очищены, то транскрипция не пойдет, не получим одноцепочечные последовательности, не будет сигнала.

Рекомендованная стартовая концентрация праймеров 1мМ.

**Таблица 5.** Описание файла «Summary».

<b>Name</b>	Название ампликона
<b>Sequence</b>	Нуклеотидная последовательность ампликона
<b>Left Primer</b>	Нуклеотидная последовательность прямого праймера
<b>Right Primer</b>	Нуклеотидная последовательность обратного праймера
<b>Size</b>	Размер ампликона
<b>CpGs</b>	Количество CpG
<b>Tm</b>	Температура плавления

## 2. Бисульфитная конверсия

Бисульфитная конверсия – процесс дезаминирования неметилированного цитозина и конвертации его в урацил. Бисульфит действует на одноцепочечную ДНК и превращает цитозин в урацил, при этом метилированный цитозин остается неизменным.

При проведении бисульфитной конверсии и работе с конвертированной ДНК с образцами рекомендуется обращаться так же, как и с РНК, а также избегать замораживания. Заморозка/разморозка образцов после бисульфитной конверсии может привести к деградации, а также заметным различиям в оценке степени метилирования между постановками для одного и того же образца. Даже в случае проведения амплификации непосредственно после этапа бисульфитной конверсии для более надежной количественной оценки степени метилирования рекомендуется ставить образцы в повторах и для анализа брать среднее значение между повторами.

Бисульфитную конверсию рекомендуется проводить в двух или, если есть возможность, в трёх повторах, и пулировать повторы для увеличения количественного выхода ДНК. Для амплификации рекомендуется брать не менее 700 нг конвертированной ДНК на реакцию.

Для проведения бисульфитной конверсии ДНК можно использовать любые коммерческие наборы. Производитель (Agena Bioscience) рекомендует наборы производства Zymo Research: EZ-96 DNA Bisulfite Treatment Kit (10131) и EZ DNA Bisulfite Treatment Kit (10132).

Для наиболее эффективной конверсии необходимо проводить инкубацию по модифицированному протоколу (см. таблицу 5).

**Таблица 6.** Модифицированная программа инкубации для бисульфитной конверсии.

Этап	Температура	Продолжительность	
Денатурация	95 °С	30 секунд	20 циклов
Конверсия	50 °С	15 минут	
Охлаждение	4 °С	∞ (не менее 15 минут)	Hold

Элюцию необходимо проводить в два этапа следующим образом: добавить 15 мкл HPLC-grade воды на колонку, оставить на 2 минуты, после этого центрифугировать, добавить ещё 15 мкл воды, инкубировать и открыть.

Если бисульфитная конверсия проводилась для повторов, объединить повторы каждого образца в один пул и тщательно перемешать. Внимание! Не смешивайте разные образцы!

### 3. Пробоподготовка MassCLEAVE

#### 3.1. Реагенты

**Таблица 7.** Два варианта комплектации наборов для пробоподготовки.

Набор	Артикул	Состав
EpiTYPER® Reagent Kit (192 реакции)	10239	Реагенты для транскрипции и урацил-специфичного гидролиза без чипов и ПЦРной части и SAP.
"MassCLEAVE™ Reagent and SpectroCHIP® Kit - CPM (2x96)" с 2 чипами	10247F	Реагенты для ПЦР, SAP, реакции MassCLEAVE и 2 чипа.

#### 3.2. Амплификация

- Внесите по 2 мкл ДНК после бисульфитной конверсии в лунки нового ПЦР планшета.
- Приготовьте ПЦР смесь на нужное количество образцов плюс запас (1-2 точки) в соответствии с таблицей 7.
- Перемешайте готовую ПЦР смесь 5 секунд на вортексе и открутите для сброса капель.

**Таблица 8.** Приготовление ПЦР смеси (расчёт на 1 точку).

Реагент	Объем (мкл)	Концентрация в реакционной смеси
HPLC-grade вода	2.84	-
ПЦР буфер 10X с 20 mM MgCl <sub>2</sub>	1.00	1x
Смесь терминирующих нуклеотидов (dNTP) 25 mM	0.08	200 μM
Полимераза 5 U/μL	0.08	0.4 U/μL
<b>Объём смеси</b>	<b>4.00</b>	
Прямой праймер 1мкM	2.00	200 nM
Обратный праймер 1мкM	2.00	200 nM
<b>Объём ПЦР смеси</b>	<b>8.00</b>	
ДНК (5 нг/мкл)	2.00	
<b>Общий объём реакционной смеси</b>	<b>10.00</b>	

- Внесите по 8 мкл ПЦР смеси в каждую лунку ПЦР планшета с образцами.
- Заклейте пленкой и отцентрифугируйте 1 минуту на скорости 560 x g.
- Поставьте ПЦР планшет в термоциклер на инкубацию по программе, указанной в таблице 8.

**Таблица 9.** Программа амплификации.

Этап	Температура	Продолжительность	
Денатурация	95°C	4 минуты	
Денатурация	95°C	20 секунд	45 циклов
Отжиг	56°C *	30 секунд	
Элонгация	72°C	1 минута	
Элонгация	72°C	3 минуты	
Охлаждение	10°C	∞	Hold

\* Выставить температуру отжига в соответствии с температурой плавления праймеров (T<sub>m</sub>).

В случае низкой эффективности амплификации ДНК после бисульфитной конверсии можно использовать амплификацию с температурным градиентом (touch-down амплификацию):

**Таблица 10.** Программа амплификации с температурным градиентом.

Этап	Температура	Продолжительность	
Денатурация	95°C	15 секунд	
Денатурация	95°C	20 секунд	10 циклов
Отжиг	62°C	30 секунд	
Элонгация	72°C	60 секунд	
Денатурация	95°C	20 секунд	40 циклов
Отжиг	61.8°C*	30 секунд	
Элонгация	72°C	60 секунд	
Элонгация	72°C	5 минут	
Охлаждение	15°C	∞	Hold

\*Снижать температуру отжига на 0.2 °C в каждом последующем цикле.

### 3.3. Очистка с помощью SAP

Дефосфорилирование и инактивация неприсоединившихся нуклеотидов с помощью фермента SAP (щелочной фосфатазы креветки).

- Приготовьте смесь SAP на нужное количество образцов плюс запас (1-2 точки) в соответствии с таблицей 10.

**Таблица 11.** Приготовление реакционной смеси SAP (расчёт на 1 точку).

Реагент	Объем (мкл)
HPLC-grade вода	3.4
Фермент SAP	0.6
<b>Объём смеси</b>	<b>4.00</b>

- Перемешайте 5 секунд готовую смесь SAP на вортексе и откройте для сброса капель.
- Внесите по 4 мкл смеси SAP в каждую лунку ПЦР планшета с реакционной смесью.
- Заклейте пленкой и отцентрифугируйте 1 минуту на скорости 3000 x g.
- Поставьте ПЦР планшет в термоциклер на инкубацию по программе, указанной в таблице 12.

**Таблица 12.** Программа инкубации для очистки SAP.

Этап	Температура	Продолжительность
Очистка	37°C	20 минут
Инактивация фермента SAP	85°C	5 минут
Охлаждение	10°C	∞

### 3.4. Реакция MassCLEAVE

Транскрипция *инвитро* с последующим расщеплением молекул конвертированной ДНК по урацилам. В результате реакции получаются продукты гидролиза для метилированной и неметилированной ДНК, которые совпадают по длине, но отличаются по нуклеотидному составу и, соответственно, по массе.

- Приготовьте смесь MassCLEAVE на нужное количество образцов плюс запас (1-2 точки) в соответствии с таблицей 12.
- Перемешайте 5 секунд готовую смесь MassCLEAVE на вортексе и открутите для сброса капель.

**Таблица 13.** Приготовление реакционной смеси MassCLEAVE (расчёт на 1 точку).

Реагент	Объем (мкл)	Концентрация в реакционной смеси
HPLC-grade вода	3.21	-
Буфер T7 Polymerase 5X	0.89	0.64x
Смесь T Cleavage	0.22	-
DTT, 100mM	0.22	3.14 mM
T7 РНК-ДНК Полимераза	0.40	-
RNase A	0.06	0.09 mg/mL
<b>Объём смеси</b>	<b>5.00</b>	

- Внесите по 5 мкл смеси MassCLEAVE в лунки **нового** ПЦР планшета.
- Отцентрифугируйте планшет с образцами после реакции SAP 1 минуту на скорости 540 x g.
- Внесите по 2 мкл образцов после SAP в лунки ПЦР планшета с реакционной смесью MassCLEAVE. Внимание! Меняйте наконечники после каждого диспенсирования. Планшет с образцами после очистки можно хранить на -20 °C.
- Заклейте планшет реакционной смесью для транскрипции и гидролиза пленкой и отцентрифугируйте 1 минуту на скорости 540 x g.
- Поставьте ПЦР планшет в термоциклер на инкубацию по программе, указанной в таблице 14.

**Таблица 14.** Программа инкубации для реакции MassCLEAVE.

Этап	Температура	Продолжительность
Инкубация	37°C	3 часа (180 минут)
Охлаждение	4°C	∞ (обязательно охладить до 4°C)

Переходите к анализу образцов максимально быстро после завершения инкубации. В случае отсутствия возможности продолжить работу непосредственно после завершения реакции, можно оставить образцы на 12 часов на -20°C. Внимание! Не храните продукты реакции на 4°C.

### 3.5. Разведение водой

Внесите по 41 мкл HPLC-grade воды в каждую лунку ПЦР планшета с реакционной смесью.

## 4. Параметры запуска

**Таблица 15.** Параметры запуска в ПО SpectroACQUIRE для работы с MassCLEAVE.

Параметр	Значение
Use Autotune	Убрать галочку
Start Dispense Condition	1000
Resin Volume	13 мкл
Sample Volume	30
Chip Heat	selected; 30
Chemistry	MassCLEAVE
Parameter File	MassCLEAVE_CPM.par (acquisition parameters: 30/10/7/7)
Turn Off HV After Analysis	Поставить галочку
Analyze Calibrant Pads	Поставить галочку
Filter Saturated Shots	Поставить галочку