

1. Ile próbek przewiduje Zamawiający? Czy próbki będą wysłane w jednej czy kilku transzach?

Dokładna ilość będzie uwarunkowana ceną za próbkę oraz tym z ilu pobranych prób uda się wyizolować DNA. Środowisko, z którego izolowane jest DNA jest środowiskiem trudnym (płonące hałdy, dużo zanieczyszczeń związkami organicznymi oraz metalami ciężkimi) i wciąż jesteśmy w trakcie izolacji. Przewidujemy ostatecznie kilkanaście próbek - około 11, jednak koszt za próbkę może mieć wpływ na ostateczną ilość. Jeśli będziemy w stanie wysłać próbki razem w jednej transzy, ale gdybyśmy musieli jeszcze jakieś izolacje powtarzać to nie wykluczone, że próbki będą wysłane w 2 maksymalnie 3 (mało prawdopodobne) transzach.

2. Czy Zamawiający wymaga użycia zestawu PCR-free do przygotowania bibliotek do sekwencjonowania? Przedstawiona wartość stężenia DNA 2 ng/ml w 20 ml może okazać się za niska do przygotowania tego typu biblioteki.

Tak, sekwencjonowanie chcemy aby było przeprowadzone bez konieczności amplifikacji aby nie ryzykować wprowadzenia dodatkowych zmian w DNA, szczególnie że biorąc pod uwagę środowisko zakłady obecność tam unikatowych genów i sekwencji. Ponownie ze względu na charakter środowiska i trudności w izolacji DNA, ilość wyizolowanego materiału jest niewielka, jedynym sposobem na zwiększenie stężenia wydaje się obecnie po testach wielu metod zwiększenie ilości materiału, z którego DNA jest izolowane, jednak to nie wchodzi w grę z powodów technicznych (praca na zbyt dużych objętościach chociażby do wirowania). Po zaznajomieniu się z metodami i przeprowadzeniu badań rynku (konsultacji z kilkoma firmami) przed rozpoczęciem projektu przedstawiona wartość stężenia - 2 ng/ μ L w 20 μ L próbki, powinna być wystarczająca. Stężenie zawarte w ogłoszeniu jest w ng/ μ L (mikrolitr) nie ml i objętość próbki też jest wyrażona w μ L (mikrolitrach).

3. Zamawiający wymaga przeprowadzenia testowego sekwencjonowania (z wykorzystaniem platformy Illumina MiSeq; 2x300 bp; 0.1 Gbp/próbkę), jednakże, dysponuje próbkami DNA o niskich stężeniach (2ng/ μ l w 20ul). W takim przypadku wymagane byłoby przygotowanie dwóch bibliotek do sekwencjonowania, jedna dla platformy miseq a druga dla novaseq, co może okazać się niemożliwe do wykonania z powodu zbyt małej ilości DNA. Czy Zamawiający wykreśli zapis „- przeprowadzić testowe sekwencjonowanie (z wykorzystaniem platformy Illumina MiSeq; 2x300 bp; 0.1 Gbp/próbkę)”?

Przeprowadzenie testowego sekwencjonowanie ma na celu ocenę przydatności próbki do sekwencjonowania - jak wyżej jest to DNA izolowane z trudnej materiału i ekstremalnych warunków. Jeśli sekwencjonowanie niektórych próbek ze względu na obecność inhibitorów nie byłoby całkowicie możliwe (np. szybka inhibicja reakcji), nie chcielibyśmy wydawać pieniędzy na sekwencjonowanie platformą NovaSeq tych próbek. Ilość DNA jest niska, co wynika z charakteru samych próbek (jak w poprzednim punkcie), jednak po zaznajomieniu się z metodami oraz badaniu rynku powinna być wystarczająca do przeprowadzenia analiz zawartych w ogłoszeniu.

4. Czy wszystkie próbki mają podobne parametry DNA tj. 2 ng/ml w 20 ml? Czy możliwe jest przesłanie parametrów dla wszystkich próbek?

Stężenie zawarte w ogłoszeniu jest w ng/ μ L (mikrolitr) nie ml i objętość próbki też jest wyrażona w μ L (mikrolitrach).

Nie, próbki znacznie różnią się zarówno stężeniem jak i jakością wyizolowanego DNA. Dokładna ocena, stężenia nie jest możliwa z wykorzystaniem dostępnej u nas aparatury, ze względu na obecność dodatkowych substancji wpływających na pomiary spektrofotometryczne w próbkach

(pomiar przy wykorzystaniu nanodropu). Uzyskane przez nas wartości pomiarów są z pewnością zawyżone. Dodatkowo próbki były weryfikowane na żelu agarozowym, jednak wykrycie ilości DNA poniżej 20 ng / kieszonkę było w naszych warunkach niemożliwe - oszacowane poprzez równoległą elektroforezę serii rozcięć DNA o znanej koncentracji (komercyjne DNA). Metody Qubit czy TapeStation są u nas niedostępne.

Stężenia uzyskane pomiarem spektrofotometrycznym z dotychczas wyizolowanych próbek wahają się pomiędzy 1.1 ng/μl a 97.50 ng/μl. Jednak jak zaznaczyłem powyżej pomiar ten jest najprawdopodobniej zawyżony (potwierdza to zarówno żel agarozowy - próbki różniące się 2-3 stężeniem świecą z podobną intensywnością [mierzoną intensywnością sygnału dla próbek poddanych tej samej ekspozycji, przy braku saturacji sensora) jak i fakt, że peak w pomiarze najczęściej jest przesunięty i występuje przy długości fali 270 nm. Stąd w ogłoszeniu jest zawarty wymóg dodatkowego oczyszczania próbek. Parametry A260/280 w większości osiągają wartości w okolicach 1.5 (jedna izolacja osiągnęła wartość 1.88); parametr A260/230 w okolicach 1.1 (tutaj jednak są znaczne wahania, wiele próbek ma wartości poniżej 1; 2 próbki mają wartości 1.8 i 2). Jest to zakres wyników dla prób, z których izolacja już została przeprowadzona. Na dzień dzisiejszy nie dysponuję zestawieniem wszystkich próbek w formie elektronicznej, ponieważ wciąż trwa izolacja, planujemy zakończyć izolację w przeciągu najbliższego tygodnia, dwóch.

Na potrzeby projektu chcielibyśmy zsekwencjonować DNA z jak najbardziej różnorodnych prób aby uzyskać jak najpełniejsze informacje o badanym materiale - jest to bardzo heterogenne środowisko.

5. Czy zamawiający wyraża zgodę na przeprowadzenie kontroli jakościowo-ilościowej na urządzeniu Bioanalyzer?

Jeżeli urządzenie dostarcza takiego samego zakresu danych kontroli jakości jak Qubit i TapeStation to tak. Z mojego doświadczenia Qubit jest bardziej precyzyjny jeśli chodzi o ocenę stężenia dwuniciowego DNA, z kolei TapeStation informuje o wielkości fragmentów DNA w badanej próbce. Urządzenia Bioanalyzer nigdy nie używałem więc nie wiem w jakim zakresie jest w stanie zastąpić wyżej wymienione metody.

6. Czy cena sekwencjonowania za jedną próbkę ma zawierać sekwencjonowanie na platformie NovaSeq firmy Illumina i jednocześnie sekwencjonowanie na platformie MiSeq firmy Illumina?

Najlepiej tak. Sekwencjonowanie platformą MiSeq ma głównie na celu sprawdzenie czy próbki po ewentualnym doczyszczeniu (co obecnie wydaje się konieczne dla zdecydowanej większości próbek) będą mogły być sekwencjonowane czy będą silnie inhibować reakcję. Gdyby coś takiego miało miejsce, sekwencjonowanie docelowe na platformie NovaSeq byłoby bezcelowe. Jednak zakładając, że wszystkie próbki będą w stanie być sekwencjonowane chcielibyśmy dostosować ich ilość odpowiednio do finansów jakimi dysponujemy.

Jak zostało wspomniane, próbki najprawdopodobniej będą wymagać doczyszczenia. Izolaty DNA są z trudnego środowiska, w którym jest obecnych dużo zanieczyszczeń zarówno organicznych (WWA, związki fenolowe, chlorofenolowe, organometaliczne) jak i nieorganicznych (głównie sole metali ciężkich). Po wielokrotnych próbach zarówno z wykorzystaniem komercyjnych kitów do izolacji DNA środowiskowego jak i protokołów 'in-house' DNA udaje się wyizolować, jednak parametry jakości oceniane spektrofotometrycznie oscylują w okolicach A260/280 - 1.5; A260/230 - 1.1 (w większości około 0.9), peak absorpcji jest przesunięty na 270 nm. Weryfikacja na żelu agarozowym dla większości próbek potwierdza obecność dwuniciowego DNA (jednak stężenie mierzone spektrofotometrycznie jest znacznie zawyżone); w próbkach, których nie udało się zweryfikować na żelu DNA wciąż może być obecne (standard o znanym stężeniu nie był wykrywalny gdy ilość DNA była poniżej 20 ng/ kieszonkę). W laboratorium obecnie nie posiadamy innych możliwości weryfikacji stężenia DNA. Jednocześnie, to że ilość jest niewielka nie jest zaskakujące dla nas biorąc pod uwagę środowisko, z którego pochodzą izolowane próbki.

7. Czy zamawiający dostarczy izolaty DNA, materiał z płonących hałd, czy kultury bakterii na płytkach agarowych (w przypadku dwóch ostatnich trzeba uwzględnić dodatkowy koszt izolacji DNA)?

Wyślemy wyizolowane DNA, które w większości próbek może wymagać doczyszczenia, co zostało uwzględnione w ogłoszeniu. Używając komercyjnych kitów do izolacji DNA z prób środowiskowych (QIAGEN; A&A Biotechnology) nie udało się wyizolować DNA z badanych prób. Obecnie wykorzystuje protokołu wypracowanego u nas w laboratorium w oparciu o kilka metod dostępnych w literaturze.

8. Czy zamawiający wyraża zgodę na dostarczenie wyników po wstępnej analizie bioinformatycznej tj. pliki w formacie fastq, oraz plik excel z % udziałem taksonów w próbce + raport pdf?

Projekt jest przede wszystkim nastawiony na ocenę jakościową badanych prób. Chcemy sekwencjonować cały metagenom (sekwencjonowanie shotgun), a nie wybrane amplikony na podstawie, którego będziemy się starali zrekonstruować genomy organizmów środowiskowych. Założenia jeśli chodzi o próby mogą uniemożliwić odpowiednią ocenę częstości występowania poszczególnych taksonów. Na pewno oczekivalibyśmy dostarczenia surowych wyników (assembly, binning, annotation, jesteśmy w stanie przeprowadzić i posiadamy dostęp do odpowiedniej mocy obliczeniowej). Dalsze analizy również możemy wykonać. Tak więc dodatkowe opracowanie wyników jest zawsze mile widziane, jednak nie jest wymagane, zależy nam na otrzymaniu surowych wyników.

9. Czy zamawiający wyraża zgodę na termin realizacji 2 miesiące kalendarzowe od momentu, kiedy próbki przejdą kontrolę ilości i jakości?

Generalnie tak, z zaznaczeniem, że jak było uwzględnione w ofercie dostarczone próbki mogą wymagać doczyszczenia po początkowej ocenie jakości.

10. Czy Zamawiający wyraża zgodę, aby testowe sekwencjonowanie na aparacie Illumina MiSeq wykonać w trybie 2x250 pz, a nie 2x300 pz?

Docelowo biblioteki mają być sekwencjonowane na aparacie Illumina NovaSeq, gdzie mamy możliwość wykonania go w trybie 2x150 pz i dla takiej długości odczytów będzie optymalizowana wielkość bibliotek. Dlatego każdy dłuższy odczyt w tym przypadku nie ma już właściwie wartości merytorycznej. Proponowany tryb 2x250 pz jest u nas rutynowo używany w sekwencjonowaniu bibliotek metagenomicznych typu np. 16S rRNA, jako dający lepszą jakość wyników bez konieczności odcinania kiepskiej jakości końców odczytów o długości 300 pz. Stąd z technicznego punktu widzenia mielibyśmy możliwość dołączenia Państwa bibliotek do takiego sekwencjonowania, bez jakiegokolwiek straty dla oceny jakościowej wyników takiego testowego sekwencjonowania. Sekwencjonowanie w trybie 2x300 pz na MiSequ nie wnosi zatem żadnej dodatkowej informacji, a w przypadku naszego laboratorium, nie byłoby ekonomicznie opłacalne, aby je móc uruchomić.

Ze względu na pochodzenie prób DNA, które będą wyizolowane z trudnego środowiska (obecności licznych substancji organicznych jak fenole, chlorofenole, WWA, związki metaloorganiczne, jak i nieorganicznych - metale ciężkie) sekwencjonowanie MiSeq ma na celu sprawdzenie czy próbki będą inhibować reakcję i w jakim tempie. Gdyby inhibicja następowała szybko, przed przystąpieniem do docelowego sekwencjonowania część próbek mogłaby zostać pominięta/wymieniona aby nie ponosić kosztów sekwencjonowania NovaSeq dla tych prób. Wartość merytoryczna tego testowego

sekwencjonowania schodzi na dalszy plan biorąc pod uwagę wymaganą min. ilość danych (0.1 Gbp/próbkę).

Ze względu na cel testowego sekwencjonowania preferowanym trybem jest 2x300 pz.

11. Wykonawca mając bogate doświadczenie w przygotowaniu bibliotek różnymi protokołami na sekwencjonowanie na platformach Illumina sugeruje zmianę podejścia metodycznego i zastosowanie protokołu np. Illumina DNA Prep, Tagmentation. Przy tego rodzaju trudnych próbkach środowiskowych o niskim stężeniu i objętości podejście bez kroku amplifikacji grozi utratą materiału bez otrzymania biblioteki o parametrach nadających się na sekwencjonowanie na aparat NovaSeq. Czy Zamawiający wyraża na to zgodę?

Tak.

12. Co Zamawiający rozumie poprzez zapis "sekwencjonowanie typu shot-gun z pominięciem dodatkowych kroków amplifikacji DNA z próbek"? Co rozumiane jest tu jako niechciane, dodatkowe kroki amplifikacji DNA?

W przypadku wykonania tego typu bibliotek genomowych z próbek środowiskowych proponowalibyśmy bowiem zestaw Illumina DNA Prep, Tagmentation, który przy minimalnej ilości DNA wsadowego powinien z użyciem amplifikacji poradzić sobie z otrzymaniem właściwej biblioteki. Istnieją rzeczywiście inne protokoły typu PCR-free, bez kroków amplifikacji, ale wymagają one na starcie potężnego wsadu DNA o świetnej jakości, a jak pisze Zamawiający, takiego nie będzie.

Tak, optymalne byłoby przeprowadzenie sekwencjonowania PCR-free aby uniknąć ryzyka wprowadzania zmian w otrzymanych sekwencjach na podstawie, których planujemy rekonstruować genomy. Ilość DNA jest niska i projekt jest wyzwaniem lecz po konsultacjach z kilkoma firmami w czasie przygotowywania i planowania projektu zamieszczona minimalna ilość DNA powinna być wystarczająca. Ponieważ wciąż nie ze wszystkich prób DNA zostało wyizolowane nie jesteśmy w stanie powiedzieć ile z prób, które będziemy chcieli sekwencjonować będzie miało takie stężenie (rozpiętość zarówno stężenia jak i jakości jest spora, stąd też wymóg opcjonalnego przeprowadzenia doczyszczania wysłanych prób). Biorąc pod uwagę, że środowisko jest dość heterogenne w projekcie zależy nam na uzyskaniu wyników z możliwie najszerszego spektrum próbek.