**Приготовление GBS-библиотек с помощью ферментов рестрикции HindIII и NlaIII:**

Процесс приготовления любых геномных библиотек можно разделить на несколько основных этапов:

1. Подготовка образцов ДНК - Разведение ДНК до нужной концентрации
2. Подготовка адаптеров: стандартных и баркодированных
3. Рестрикция ДНК и лигирование адаптеров
4. Очистка библиотеки
5. Насыщение библиотеки с помощью ПЦР
6. Финальная очистка и отбор фрагментов определенного размера при необходимости

**Полный перечень всех необходимых реактивов:**

1. QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) - очистка библиотеки на промежуточных этапах и после окончания подготовки перед секвенированием
2. AMPureXP (Beckman Coulter) - селекция фрагментов небходимого размера (size selection) и очистка библиотеки на промежуточных и финальном этапах (или аналоги, например, SmartBeads фирмы Sesana)
3. Qubit dsDNA HS Reagent (Invitrogen) - измерение концентрации геномной ДНК и адаптеров (или аналоги, например, производства фирмы Lumiprobe)
4. Qubit dsDNA HS буфер (Invitrogen)
5. Qubit dsDNA HS Стандарт 1 (Invitrogen)
6. Qubit dsDNA HS Стандарт 2 (Invitrogen)
7. 95% этанол
8. Буфер 1x TE (pH 8.0) - разведение адаптеров
9. Олигонуклеотиды для приготовления адаптеров простые и баркодированные (см.методика приготовления см.п.2.1)
10. 10x NEB буфер 2.1 (NEB #B7202)
11. 10x Cut Smart NEB (NEB #B7204)
12. Рестриктаза HindIII-HF (NEB #R3104, 20,000 ед/мл)
13. Рестриктаза NlaIII(NEB #R0125, 10,000 ед/мл) или аналог рестриктазы - рестриктаза FaeI (Например, СибЭнзим #SE-E495)
14. T4 ДНК-лигаза (NEB #M0202 или СибЭнзим #SE-E319).
15. Буфер для T4 ДНК-лигазы
16. Taq 5x NEB MasterMix (NEB #M0285L)
17. mQ H2O

**Протокол подготовки библиотек**

**Этап 1. Подготовка образцов ДНК**

**1.1 Разведение ДНК до нужной концентрации**

Рабочая концентрация ДНК составляет 10 нг в 10 мкл (10 нг/мкл). Общее количество ДНК одного образца, необходимое для анализа составляет 100 нг.

Для оценки концентрации геномной ДНК в препаратах необходимо произвести измерение концентрации на флуориметре Qubit с использованием набора High Sensitivity для получения максимально точных измерений (см. Протокол в Приложении).

Далее необходимо вычислить количество деионизированной воды (mQ H2O), которую необходимо добавить в препаратам ДНК, для разведения их до рабочей концентрации 10 нг/мкл.

Проводим разведение. После разведения необходимо снова проверить концентрацию каждого образца с использованием флуориметра Qubit и при необходимости, провести коррекцию разведения.

**Этап 2. Подготовка адаптеров: стандартных и баркодированных**

Подготовка стоковых растворов одноцепочечных адаптеров: лиофилизированные адаптеры (неспецифические и баркодированные) необходимо развести деионизованной водой mQ до концентрации 200 мкМ. Количество воды, необходимое для получения стоков адаптеров с концентрацией 100 мкМ обычно указывается производителем при получении лиофилизированных адаптеров. В данном случае необходимо добавить в 2 раза меньше воды.

Стоки обычно готовятся заранее и могут храниться достаточно долгое время на -20**°**С.

**2.1 Подготовка адаптеров: стандартные адаптеры и баркодированные адаптеры**

Каждый адаптер собирается с помощью процедуры отжига из двух комплементарных олигонуклеотидов. При этом последовательность одного из адаптеров включает баркод, а второй адаптер является универсальным - общим для всех образцов.

После проведения этой процедуры адаптеры стабильны и могут храниться неопределенно долго при -20 °С.

Протокол сборки адаптеров для рестриктазы HindIII:

1. В отдельном планшете/стрипе для стандартных и баркодированных адаптеров смешиваем:

* Top strand олигонуклеотид (200 мкМ) - 5 мкл
* Bottom strand олигонуклеотид (200 мкМ) - 5 мкл
* Буфер 1xTE - 10 мкл

В общем объеме 20 мкл. Перемешиваем пипетированием или на Vortex. После смешивания двух комплементарных нуклеотидов и их отжига друг с другом концентрация полученных адаптеров составляет **50 мкМ.**

1. Далее проводим сборку комплементарных олигонуклеотдиов путём отжига при определённых условиях:

* 95 °C в течение 2 мин;
* Понижение температуры до 25 °C с шагом 0.1 °C/с;
* Инкубация при 25 °C – 30 мин;
* Удержание на + 4 °C.

В результате мы получаем стоки двуцепочечных адаптеров с концентрацией **50 мкМ**. Стоковые адаптеры стабильны и хранятся при температуре -20 °C неопределённо долго.

**Проверка сборки адаптеров (очень важный шаг!!!)**

Для проверки качества сборки адаптеров на 4 % агарозный гель наносится по 3 мкл адаптеров до сборки и после сборки. Размер успешно собранных адаптеров около 45 пн. По размеру можно отличить двунитевые от однонитевых адаптеров. Двунитевые будут медленнее бежать в геле, отставая на несколько мм от однинитевых исходных олигонуклеотидов.

1. Первое разведение адаптеров.

На данном этапе проводим разведение обоих типов адаптеров - стандартных и баркодированных. Концентрация обоих типов адаптеров после первого разведения составляет 5 мкМ.

Разведение проводим в новой плашке/стрипе. Для этого смешиваем:

50 мкМ сток готовых адаптеров - 5 мкл;

1Х ТЕ - 45 мкл.

Общий объем смеси 50 мкл.

Перемешиваем пипетированием и вортексированием, сбрасываем капли со стенок и крышки на Vortex.

Полученная концентрация в пересчете на нг будет составлять примерно 80 нг/мкл.

**Важно! Стандартные адаптеры дальше не разводятся. Мы будем использовать их в полученной после первого разведения концентрации (5 мкМ).**

1. Второе разведение баркодированных адаптеров.

На данном этапе готовим рабочий раствор баркодированных адаптеров с концентрацией 0.5 мкМ, то есть разводим их в 10 раз.

Разведение проводим в новой плашке/стрипе. Для этого смешиваем:

50 мкМ сток готовых адаптеров - 5 мкл;

1Х ТЕ - 45 мкл.

Общий объем смеси 50 мкл.

Перемешиваем пипетированием и вортексированием, сбрасываем капли со стенок и крышки на Vortex.

Для получения синонимичного количества прочтений каждого образца геномной ДНК, необходимо измерить полученные концентрации адаптеров с помощью флуориметра Qubit 2.0 и при необходимости довести концентрации до примерно одинаковых значений для каждого индивидуального адаптера. Полученная концентрация в пересчете на нг будет составлять примерно 6-8 нг/мкл.

В результате мы получили рабочие разведения стандартных (5 мкМ) и баркодированных адаптеров (0.5 мкМ).

Важно отметить, что полученные рабочие растворы нестабильны, хранятся при температуре -20 °C непродолжительное время. В связи с этим, при подготовке каждой новой библиотеки желательно готовить рабочие стоки свежими.

Список образцов и использованных адаптеров:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Номер образца** | **Название образца** | **Баркод** |
| **1** |  |  |
| **2** |  |  |
| **3** |  |  |
| **4** |  |  |
| **5** |  |  |
| **6** |  |  |
| **7** |  |  |
| **8** |  |  |
| **9** |  |  |
| **10** |  |  |
| **11** |  |  |
| **12** |  |  |

Баркодированный адаптер:

Верхняя цепь: 5'-ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT**AACAATG**-3'

Нижняя цепь: 3'-TGTGAGAAAGGGATGTGCTGCGAGAAGGCTAGA**TTGTTAC**TCGA-5'

Баркод - **AACAATG**

Неспецифический стандартный адаптер:

Верхняя цепь: 5'-AGATCGGAAGAGCGGTTCAGCAGGAATGCCGAG-3’

Нижняя цепь: 3’-GTACTCTAGCCTTCTCGCCAAGTCGTCCTTACGGCTC-5’

**Этап 3. Рестрикция ДНК и лигирование адаптеров**

**3.1 Рестрикция ДНК**

Рестрикцию геномной ДНК проводим двумя рестриктазами HindIII и NlaIII (или FaeI). Сайт рестрикции HindIII соответствует баркодированным адаптерам, к месту разрезания второй рестриктазой NlaIII лигируется неспецифический стандартный адаптер. Лигирование образцов с соответствующими адаптерами обязательно проводим сразу после реакции рестрикции. Адаптеры сразу добавляются в смесь для рестрикции, но не подвергаются рестриции, так как у них отсутствуют сайты узнавания. Лигазу инактивируем нагреванием образцов до 65 **°**С в течение 20 мин.

**3.1.1 Первая рестрикция и лигирование образцов ДНК с баркодами**

Для проведения рестрикции необходимо смешать следующие компоненты в расчете на одну реакцию (финальный объем 20 мкл):

10 мкл – ДНК с концентрацией 10 нг/мкл + 2 мкл -- баркодированного адаптера во втором разведении (0,5 мкМ) + 8 мкл Мастер микс для рестрикции

Смесь Мастер микс для рестрикции (**расчет на одну реакцию**):

10X NEB Buffer 2.1 – 2 мкл

Hind III (20 U/мкл) - 0.5 мкл

H20 - 5.5 мкл

Режим проведения рестрикции:

37 °C – 1 ч;

65 °C – 20 мин;

Далее 4 °C

Произвести, не откладывая, лигирование.

После рестрикции сразу приступаем к проведению реакции лигирования.

**Хранение образцов на данном этапе не рекомендуется.**

Заранее подготовленный Мастер микс добавляем в объёме 30 мкл к каждой реакции лигирования (20 мкл). Общий объём получаемой реакции лигирования составляет 50 мкл.

Требуемое количество реактивов для лигирования из расчета на одну реакцию (финальный объем 30 мкл):

T4 буфер (СибЭнзим) - 5 мкл

T4 лигаза (200U/мкл, СибЭнзим) - 3.2 мкл

H20 - 21.8 мкл

Режим проведения лигирования:

22 °C – 1ч

65 °C – 10 мин

Далее 4 °C

Полученную реакцию лигирования можно хранить при минус 20 °C в течение некоторого времени.

**3.1.2 Пулирование и первая очистка библиотеки**

После первого этапа рестрикции и лигирования адаптеров проводим смешивание образцов для получения общего пула-библиотеки. Для этого отбираем по 40 мкл каждого образца в пробирку Эппендорф для получения общего объема 480 мкл в случае работы с 12 образцами.

Очистку библиотеки на данном этапе подготовки проводим с помощью набора для очистки ДНК QIAquick PCR Purification Kit  (Qiagen) согласно протоколу производителя (в Приложении).

Библиотеку элюируем в 30 мкл EB-буфера (имеется в наборе для очистки).

**3.1.3 Вторая рестрикция и лигирование со стандартным адаптером**

На данном этапе мы проводим одну реакцию рестрикции с помощью рестриктазы NlaIII (FaeI) на очищенном пуле образцов. Также как и на предыдущем этапе, мы сразу добавляем адаптеры с смесь для рестрикции.

Для проведения рестрикции необходимо смешать следующие компоненты:

H20 +ДНК после очистки - 14 мкл

Буфер для рестриктазы 10x - 2 мкл

NlaIII (FaeI) - 1 мкл

Стандартный адаптер из первого разведения (5 мкМ) - 3 мкл

Общий объём реакции 20 мкл

Режим проведения рестрикции:

37 °C – 1 ч (15 мин, если используется рестриктаза NlaIII NEB);

65 °C – 20 мин;

Далее 4 °C

Произвести, не откладывая, лигирование.

Смесь для лигирования на одну реакцию:

H20 - 21.8 мкл

10x T4 буфер (СибЭнзим) - 5 мкл

T4 лигаза (СибЭнзим) - 3.2 мкл

Общий объём 30 мкл

Добавляем 30 мкл Мастер микса в каждую лунку. Общий объём реакции лигирования будет составлять 50 мкл.

Режим проведения лигирования

22 °C – 1 ч

65 °C – 10 мин

Далее 4 °C

Полученную реакцию лигирования можно хранить при минус 20 °C в течение некоторого времени.

**Этап 4. Очистка библиотеки**

Очистку библиотеки на данном этапе подготовки проводим с помощью набора для очистки ДНК QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) согласно протоколу производителя (в Приложении).

Библиотеку элюируем в 50 мкл EB-буфера (имеется в наборе для очистки).

Также очистку можно проводить с использованием магнитных шариков, в данном случае помимо собственно очистки может быть быть достигнут эффект отбора фрагментов библиотеки нужного размера - путем избирательного удаления фрагментов очень маленького размера.

**Этап 5. Насыщение библиотеки с помощью ПЦР**

**5.1 Обогащение библиотеки методом ПЦР**

Полученные и очищенные на предыдущих этапах пулированные библиотеки амплифицируем в режиме короткой элонгации продуктов. Такой способ амплификации специфически увеличивает количество продуктов размером 200-500 пн. При этом амплифицируются исключительно фрагменты, несущие на своих концах сайты узнавания рестриктаз HindIII и NlaIII.

Праймеры для амплификации:

Праймер 1

AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACG

Праймер 2

CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCGGTCTCGGCATTCCTGCTGA

Праймеры для амплификации содержат участки, комплементарные нуклеотидным последовательностям адаптеров, баркодированного и стандартного, и служебные последовательности, которые необходимы для проведения клональной амплификации и секвенирования на приборе Illumina.

Для обогащения библиотеки проводим классическую ПЦР реакцию.

Требуемое количество реактивов для ПЦР из расчета на одну реакцию (общий объем 25 мкл):

1. ДНК (библиотека) - 2 мкл;
2. 5x HF Mix c Phusion HF Taq - 5 мкл;
3. P1 праймер (5 мкМ) – 5 мкл
4. P2 праймер (5 мкМ) - 5 мкл;
5. mQ H2O - 8 мкл.

Для обогащения библиотеки рекомендуется проводить от 5 до 12 реакций ПЦР на одной и той же пулированной ДНК в качестве матрицы, чтобы избежать преимущественной наработки одного типа фрагментов в сравнении с другими фрагментами в одной ПЦР реакции. В данном случае, мы поставим 8 реакций ПЦР.

Условия проведения амплификации:

1. Первичная денатурация матрицы 98**°**С - 30 сек;
2. 14 циклов:

* Денатурация 98**°**С - 10 сек;
* Отжиг праймеров 65**°**С - 30 сек;
* Синтез 72**°**С - 15 сек;

1. Финальный синтез при 72**°**С - 2 мин;
2. Удержание на 4**°**C ∞.

Уменьшение количества циклов может уменьшить выход фрагментов >600 пн, которые не могут быть продуктивно секвенированы методом Illumina.

**Этап 6. Финальная очистка и отбор фрагментов определенного размера при необходимости**

После окончания ПЦР реакции необходимо отдельно очистить каждую ПЦР смесь с помощью магнитных шариков AMPure Purification Kit (или SmartBeads, протокол доступен на сайте фирмы-производителя).

Очистка с помощью AMPure beads происходит по следующему протоколу:

1. Необходимо взять 50 мкл ПЦР реакции и добавить при комнатной температуре 30 (0.6Х) мкл хорошо размешанных и выдержанных не менее 30 мин при комнатной температуре AMPure beads.
2. Аккуратно смешать пипетированием 10 раз.
3. Инкубировать при комнатной температуре без шейкера 5 мин.
4. Установить пробирку с шариками на магнитный штатив на 2 мин или

пока супернатант не очистится полностью.

1. Аккуратно отобрать из пробирки супернатант.
2. Промыть шарики свежеприготовленным 80 % этанолом. Для этого добавить 300 мкл этанола, не взбалтывать осадок на этом шаге. Инкубировать на магнитном штативе 30 секунд. Отобрать этанол. На всех этапах процедуры промывки не следует снимать пробирку со штатива.
3. Промыть второй раз этанолом (300 мкл). Убедиться, что весь избыток этанола

отобран с осадка.

1. Просушить осадок шариков 10 минут на магнитном штативе.
2. Снять пробирку с магнитного штатива и добавить 31.5 мкл 1хТЕ буфера.
3. Аккуратно пипетировать осадок 10 раз. Инкубировать при комнатной температуре 2 минуты.
4. Поместить пробирку на магнитный штатив на 2 минуты или пока супернатант не очистится от шариков.
5. Перенести супернатант в чистую пробирку и измерить концентрацию получившейся библиотеки на флуориметре Qubit с использованием набора HS.

В качестве альтернативы можно проводить очистку с помощью набора для очистки ДНК QIAquick PCR Purification Kit  (Qiagen), согласно рекомендациям протокола производителя, как делали на предыдущем этапе 3.1 и этапе 4.1.

Библиотеки элюируем в 30 мкл EB-буфера (имеется в наборе для очистки).

Концентрацию оцениваем на флуориметре Qubit с использованием набора HS.

Далее для оценки качества при любом способе очистки проводим электрофоретическое разделение полученной библиотеки в 3% агарозном геле (грубая оценка), а также методом микрокапиллярного гель-фореза на биоанализаторе Agilent 2100 (точная оценка).

**6.1 Обогащение библиотеки фрагментами необходимого размера (отбор по размеру - size selection)**

В данном методе подготовки библиотек используется технология двойной селекции размера на магнитных шариках, что позволяет производить отбор по размеру с заданной верхней и нижней границами длины, в частности, отбирать фрагменты преимущественно размером 300-500 п.н с запланированным пиком 400 п.н. Сравнение библиотек до и после двойной селекции проводится с помощью электрофореза в агарозном геле или более точно на приборе Agilent BioAnalyser.

Перед началом проведения селекции по размеру необходимо смешать (пулировать) в одной пробирке по 30 мкл очищенных амлифицированных библиотек, полученных на предыдущем этапе для получения общего пула. Далее следуем протоколу:

1. Из полученного общего пула GBS-библиотеки после очистки необходимо взять 100 мкл и перенести в новую чистую пробирку.
2. К библиотеке необходимо добавить 65 мкл (0.65х) магнитных шариков.
3. Аккуратно пипетировать 10 раз.
4. Инкубировать 5-10 минут при комнатной температуре.
5. Поместить пробирку на магнитный штатив на 2-5 мин или до полной очистки супернатанта.
6. Перенести супернатант в новую пробирку (**шарики выкинуть**).
7. Добавить 12 мкл магнитных шариков к супернатанту (0.12х).
8. Аккуратно пипетировать 10 раз.
9. Инкубировать при комнатной температуре 5-10 мин.
10. Поместить на магнитный штатив на 2-5 мин или до полной очистки супернатанта.
11. Аккуратно **удалить супернатант**, не задевая шарики.
12. Промыть шарики свежеприготовленным 80 % этанолом. Для этого добавить 300 мкл этанола, не взбалтывать осадок на этом шаге. Инкубировать на магнитном штативе 30 секунд. Отобрать и удалить этанол. На всех этапах процедуры промывки не следует снимать пробирку со штатива.
13. Промыть второй раз этанолом (300 мкл). Убедиться, что весь избыток этанола отобран с осадка.
14. Подсушить шарики на воздухе 5 мин, не снимая с магнитного штатива.
15. Снять пробирку с магнитного штатива и добавить 31.5 мкл 1хТЕ буфера.
16. Аккуратно пипетировать осадок шариков 10 раз. Инкубировать при комнатной температуре 5-10 минут.
17. Поместить пробирку на магнитный штатив на 2-5 минут или пока супернатант не очистится от шариков.
18. Отобрать супернатант в новую пробирку.
19. Проверить концентрацию на флуориметре Qubit с набором HS.