**Приготовление GBS-библиотек с помощью ферментов рестрикции PstI и MspI:**

**Полный перечень всех необходимых реактивов:**

1. QIAquick PCR Purification Kit - 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
3. Qubit dsDNA HS Reagent (Invitrogen) - измерение концентрации геномной ДНК и адаптеров
4. Qubit dsDNA HS буфер (Invitrogen)
5. Qubit dsDNA HS Стандарт 1 (Invitrogen)
6. Qubit dsDNA HS Стандарт 2 (Invitrogen)
7. 95% этанол
8. Tris-Cl, pH 8,0-8,5 - разведение адаптеров
9. NaCl - разведение адаптеров
10. Олигонуклеотиды (см.методика приготовления см.п.2.1)
11. 10X NEB Buffer 4 (NEB #B7204)
12. Рестриктаза PstI-HF (NEB #R3140, 20,000 ед/мл)
13. Рестриктаза MspI (NEB #R0106, 20,000 ед/мл)
14. T4 ДНК-лигаза (NEB #M0202).
15. Буфер для T4 ДНК-лигазы
16. Taq 5x NEB MasterMix (NEB #M0285L)
17. mQ H2O

**Этап 1. Подготовка образцов ДНК**

**1.1 Разведение ДНК до нужной концентрации**

Рабочая концентрация ДНК составляет 20 нг в 10 мкл (20 нг/мкл). Общее количество ДНК одного образца, необходимое для анализа составляет 200 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 20 нг/мкл. Проводим разведение. После разведения необходимо снова проверить концентрацию каждого образца с использованием флуориметра Qubit.

**Этап 2. Подготовка адаптеров: стандартных (неспецифические) и баркодированных (специфические)**

Подготовка стоков 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.

В случае подготовки данной библиотеки рекомендуется разводить адаптеры буфером EB (elution buffer) (рецепт ниже).

Стоки обычно готовятся заранее и могут храниться достаточно долгое время.

**2.1 Подготовка адаптеров: неспецифические (стандартные) адаптеры и баркодированные (специфические) адаптеры**

Перед тем, как приступить в приготовлению приготовлению двуцепочечных адаптеров и разведению необходимо подготовить буферы:

1X буфер элюции (EB) – 10 мМ Tris-Cl, pH 8.0-8.5

10X Адаптерный буфер (AB) – 500 мМ NaCl, 100 мМ Tris-Cl

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 минус 20 °С.

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

* верхнюю и нижнюю цепи адаптеров в количестве 10 мкл каждого
* буфер 10x AB 10 мкл
* mQ H2O 70 мкл

В общем объеме 100 мкл. Перемешиваем пипетированием или на Vortex.

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

* 95 °C в течение 5 мин
* понижение температуры до 30 °C с шагом 1 °C в минуту,
* удержание на плюс 4 °C.

{95 °С for 5 minute}x1 cycle; {95 °С-1С for 1 minute}x65 cycles.

В результате мы получаем стоки двуцепочечных адаптеров с концентрацией 10 мкМ. Стоковые адаптеры стабильны и хранятся при температуре минус 20 °C неопределённо долго.

1. В новой плашке/стрипе баркодированные двуцепочечные адаптеры (10 мкМ сток) разводим примерно до концентрации 3мкМ. Для этого полученный сток разводим в три раза. Перемешиваем пипетированием или 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 точных значений 3 мкМ для каждого индивидуального адаптера. Полученная концентрация в пересчете на нг будет составлять 50 нг/мкл.

В результате получаем сток баркодированных адаптеров с концентрацией примерно 3 мкм

1. Далее в новой плашке/стрипе нормализуем концентрацию баркодированных адаптеров до 1,6 нг/мкл (= 0,1 мкМ). Получаем финальный стоковый раствор.
2. Для приготовления стока неспецифичные обратных адаптеров – необходимо выполнить шаги 1 и 2 и оставить в двуцепочечные неспецифические адаптеры в концентрации 10 мкМ как рабочий раствор. Оцениваем концентрацию разведённых адаптеров при помощи флуориметра Qubit с использованием набора HS.
3. Готовим рабочий раствор, содержащий одновременно баркодированный и неспецифический адаптер в новой плашке/стрипе. Для этого смешиваем:

20 мкл финального стокового раствора баркодированного адаптера (0.1 мкМ)

30 мкл 10 мкМ раствора неспецифичного адаптера

50 мкл буфер 10x AB

До финального объема 100 мкл. Перемешиваем пипетированием или на Vortex. Полученный рабочий раствор содержит баркодированный адаптер в концентрации 0.02 мкМ и неспецифический адаптер в концентрации примерно 3 мкМ.

Важно отметить, что полученный рабочий сток нестабилен, хранится при температуре минус 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'-CACGACGCTCTTCCGATCTxxxxxTGCA-3'

Нижняя цепь: 5'-GTGCTGCGAGAAGGCTAGAyyyyy-3'

Неспецифический адаптер:

Верхняя цепь: 5'- СGAGATCGGAAGAGCGGGGACTTTAAGC-3’

Нижняя цепь; 3’-GATCGGTCTCGGCATTCCTGCTGAACCGCTCTTCCGATCT-5’

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

**3.1 Рестрикция ДНК**

Рестрикцию геномной ДНК проводим двумя рестриктазами Msp1 и Pst1. Сайт рестрикции Pst1 соответствует баркодированным адаптерам, к месту рестрикции второй рестриктазой лигируется неспецифический Y-адаптер. Лигирование образцов с соответствующими адаптерами обязательно проводим сразу после реакции рестрикции. Лигазу инактивируем нагреванием образцов до 65 **°**С в течение 20 мин.

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

10 мкл – ДНК с концентрацией 20 нг/мкл + 10 мкл Мастер микс для рестрикции

Смесь для рестрикции (расчет на одну реакцию):

10X NEB Buffer 4 – 2 мкл

PstI-HF (8 единиц активности) - 0,4 мкл

MspI (8 единиц активности) - 0,4 мкл

H20 - 7,2 мкл

Режим проведения рестрикции.

37 °C – 2 ч;

65 °C – 20 мин;

Далее 8 °C

Произвести, не откладывая, лигирование.

**3.2 Лигирование образцов и адаптеров**

После рестрикции сразу приступаем к проведению реакции лигирования. Хранение образцов на данном этапе не рекомендуется.

Заранее подготовленный мастер-микс добавляем в объёме 15 мкл к каждой реакции рестрикции (20 мкл) и смешиваем с 5 мкл рабочего раствора адаптеров (0,02 мкМ баркодированный адаптер; 3 мкМ неспецифический адаптер) и инкубируем при температуре плюс 22 °C в течение 120 мин, затем инактивируем реакцию при плюс 65 °C в течение 20 мин, удержание плюс 8 °C.

Требуемое количество реактивов для лигирования из расчета на одну реакцию (финальный объем 15 мкл):

NEB Buffer 4 – 2 мкл

ATP 10мМ – 4 мкл

T4 DNA лигазы (200 единиц активности) - 0,5 мкл

H20 - 8,5 мкл

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

**Этап 4. Очистка библиотеки**

**4.4 Пулирование и очистка библиотеки**

Очистку библиотеки проводим с помощью набора для очистки ДНК PCR Cleanup Kit (Qiagen).

После этапа рестрикции и лигирования адаптеров проводим смешивание образцов для получения общего пула-библиотеки.

Для этого по 20 мкл из каждой реакции лигирования добавляем в одну пробирку объемом 1.5 мл и далее следуем этапам очистки согласно протоколу производителя (в Приложении).

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

**Этап 5. Насыщение библиотеки**

**5.1 Обогащение библиотеки методом ПЦР**

Пулированные библиотеки амплифицируем в режиме короткой элонгации продуктов. Такой способ амплификации мпецифически увеличивает количество продуктов размеров 200-500 пн. При этом амплифицируются исключительно фрагменты, обладающие сайтами рестрикции Pst1 и Msp1.

Праймеры для амплификации:

Праймеры для амплификации:

Праймер 1

AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT

Праймер 2

CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCGGTCTCGGCATTCCTGCTGAA

Для обогащения библиотеки проводим классическую ПЦР реакцию.

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

1. ДНК (библиотека) - 10 мкл;
2. 5x HF Mix c Phusion HF Taq - 5 мкл;
3. Праймер 1 и 2 (2 мкл 10 мкM смеси – 5 мкM каждого праймера);
4. 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 5 реакций ПЦР.

Условия проведения амплификации:

1. Первичная денатурация матрицы 95 **°**С - 30 сек;
2. 16 циклов:

* Денатурация 95 **°**С - 30 сек;
* Отжиг праймеров 62 **°**С - 20 сек;
* Синтез 68 **°**С - 30 сек;

1. Финальный синтез при 72 **°**С - 5 мин;
2. Плюс 4 C ∞.

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

После окончания реакции необходимо смешать ПЦР реакции друг с другом и очистить с помощью магнитных шариков AMPure Purification Kit.

Очистка с помощью AMPure beads происходит по следующему протоколу:

1. Необходимо взять 100 мкл смеси ПЦР реакции и добавить при комнатной температуре 180 (1.8Х) мкл хорошо размешанных 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. На всех этапах процедуры промывки не следует снимать пробирку со штатива.
3. Промыть второй раз этанолом (300мкл). 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.

В качестве альтернативы можно проводить финальную чистку библиотеки с помощью набора для очистки ДНК PCR Cleanup Kit (Qiagen).

После этапа амплификации содержимое всех пробирок смешиваем в одну и проводим все этапы согласно рекомендациям протокола производителя, как делали на предыдущем этапе 4.1.

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

Концентрацию полученной библиотеки 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).