

Este protocolo simplificado es basado en el principio general del método desarrollado por Peterson et al. 2012 PloS one 7:e37135 con modificaciones realizadas por el Dr. Tomas Hrbek y el Dr. José Gregorio Martínez del Laboratorio de Evolución y Genética Animal – LEGAL (UFAM) de la Dra. Izeni Pires Farias y del Dr. Tomas Hrbek. El protocolo incluye secuenciamiento en la plataforma IonTorrent PGM.

Antes de comenzar este protocolo, verificar la disponibilidad de los siguientes materiales:

- Agua ultrapura
- Primer P1
- Primer P1_SdaI
- Primer A_Ion1 al A_Ion60
- Primer Y_Ion1_Csp6I al Y_Ion60_Csp6I
- Primer “P1” de amplificación
- Primer “A_amp” de amplificación
- Enzima SdaI (10 U/μL) (Fermentas)
- Enzima Csp6I (10 U/μL) (Fermentas)
- 10x Buffer Tango (Fermentas)
- T4 ADN Ligasa (5 U/μL) (Fermentas)
- BSA (1 mg/mL) (Thermo Fisher Scientific)
- ATP (5mmol) (Fermentas)
- Taq ADN polimerasa (1 U/μL) (Fermentas)
- KlenTaq (5 U/μL) (DNA polimerase Technology)
- dNTPs (10 mM)
- MgCl₂ (25 mM) (Fermentas)
- 10x Buffer de Amonia (Fermentas)
- AMPure XP Beads
- Gradilla magnética de purificación por *beads*
- Marcador molecular Lambda/HindIII (Fermentas)
- Kit comercial Qubit DNA BR Assay (Thermo Fisher Scientific)
- Fluorómetro Qubit (Thermo Fisher Scientific)
- Tubos de PCR (250 μL)
- Tubos tipo eppendorf (1.5 mL)
- Espectrofotómetro Nanodrop2000 (Thermo Scientific)
- Seleccionador automático de fragmentos genómicos (PippinPrep, Sage Science)
- Casete de corrida electroforética para PippinPrep - 1.5% DF Marker 2 cassette (Sage Sciences)
- Termociclador Veriti (Applied Biosystem)

1. Preparación de adaptadores

Existen adaptadores “P1” y “A”, los cuales son específicos para el secuenciamiento de las librerías genómicas en IonTorrent. Los adaptadores “A”

fueron contruidos con identificador molecular (*barcode*) de 10 pares de bases (60 adaptadores “A” en total con igual número de *barcodes*) y una estructura de cola “Y” divergente (Davey & Blaxter 2011). IonTorrent usa solamente el adaptador “P1” para el secuenciamiento, de modo que no existe forma directa de realizar secuenciamiento *pair-ended*. El adaptador “P1” posee un extremo cohesivo TGCA que es compatible con los extremos cohesivos generados por la digestión de la enzima SdaI en el ADN genómico, mientras que el adaptador “A” tiene un extremo cohesivo TA que es compatible con los extremos cohesivos generados por la digestión de la enzima Csp6I en el ADN genómico.

- 1.1. Prepare el adaptador “P1” a partir de los primers P1 y P1_SdaI
- 1.2. Prepare los adaptadores “A” (con *barcode*) a partir de los primers A_Ion1 y Y_Ion1_Csp6I hasta A_Ion60 y Y_Ion60_Csp6I. Sólo un adaptador “A” es usado por individuo o especie.

Haga una solución estoque estándar de 100 µM de cada uno de los primers mencionados. Junte los primers P1 y P1_SdaI permitiendo su anillamiento creando el adaptador “P1”. Junte los primers A_Ion1 y Y_Ion1_Csp6I permitiendo su anillamiento creando el adaptador A_Ion1 (repita este procedimiento para la construcción del adaptador A_Ion2 al A_Ion60). Para construir sus adaptadores, adicione 10 µL de cada oligo del par complementario en un tubo de PCR de 200 µL, adicione 0.8 µL de NaCl 5 M y posteriormente adicione 79.2 µL de TE, pH 8.0. Usando el siguiente protocolo de PCR (un ciclo), anille los dos fragmentos en termociclador:

95°C por 3 min.
65°C por 2 min.
55°C por 2 min.
45°C por 2 min.
35°C por 2 min.
25°C por 1 min.
15°C por 1 min.
4°C por siempre.

Este estoque de fragmentos anillados de 100 µL (ahora denominado como adaptador) puede proporcionarle suficientes adaptadores para múltiples ligaciones. Diluya como indicado a continuación para obtener su solución de trabajo:

A_Ion → 29.59 µL del estoque + 20.41 µL de TE 1x
P1 → 1.39 µL del estoque + 148.61 µL de TE 1x

2. Extracción de ADN genómico

La extracción de ADN de las muestras es principalmente recomendada a través del método fenol-cloroformo (Sambrook & Russell 2001). Sin embargo, el uso de ADN extraído por el método CTAB 2% (Doyle & Doyle 1987) también ha sido utilizado con éxito en nuestro laboratorio (sin observarse diferencias comprobadas) en el proceso de construcción de librerías genómicas a través

del presente método. En ambos casos, la solución para resuspender el pellet de ADN en las muestras aquí utilizadas fue agua ultrapura.

- 2.1. Evaluar la integridad del ADN extraído por electroforesis en gel de agarosa (1%). Si el ADN se muestra fragmentado, no se recomienda su uso para el proceso de desarrollo de las bibliotecas genómicas.
- 2.1. Cuantificar las muestras e intente llevarlas a una concentración homogénea para todas. Calcular el volumen de la alícuota a ser tomada conteniendo 200 ng de cada muestra.

3. Digestión de ADN genómico y ligación simultánea de adaptadores

La digestión y la ligación de adaptadores se dan de forma simultánea dentro de la misma reacción y el principio es explicado a continuación. 200 ng de ADN genómico es digerido con las enzimas de restricción de preferencia (Csp6I y SdaI en este caso) y los adaptadores “P1” y “A” son simultáneamente ligados a los fragmentos cortados con SdaI (5'-CCTGCA[^]GG-3') y Csp6I (5'-G[^]TAC-3'). El adaptador “P1” tiene un extremo cohesivo TGCA-3' correspondiente al corte generado por SdaI, pero debido a la presencia de AT en el extremo 5' del extremo cohesivo del adaptador, una vez ligado, el nuevo constructo fragmento/adaptador poseerá una secuencia CCTGCAAT que ya no será reconocida por la enzima de restricción SdaI. Como mencionado anteriormente, el adaptador “A” tiene un identificador molecular y un extremo cohesivo AT-5' correspondiente al corte generado por Csp6I, pero debido a la presencia de una Adenina en el extremo 3' del extremo cohesivo del adaptador, una vez ligado, el nuevo constructo fragmento/adaptador poseerá una secuencia TTAC la cual ya no será reconocida por la enzima de restricción SdaI. Siga el método a continuación para la preparación de una reacción de digestión/ligación:

x µL de DNA conteniendo 200 ng en total*

**individual*

2.0 µL del adaptador “A” diluído*

5.0 µL buffer TANGO

2.0 µL adaptador “P1” diluído

0.1 µL enzima de restricción SdaI

0.1 µL enzima de restricción Csp6I

0.5 µL T4 ADN ligasa

0.5 µL de ATP

x µL H₂O ultrapura

Volumen total por reacción individual: 50 µL

Identifique o rotule cada tubo de PCR (un tubo por individuo). En cada tubo deposite 200 ng de ADN del individuo a digerir junto con 2 µL de la solución de trabajo del adaptador “A” conteniendo el identificador molecular de su preferencia. Posteriormente, prepare un único mix homogéneo en tubo eppendorf de 2 mL con el resto de los reactivos para todos los individuos envueltos en la digestión. Complete con agua ultrapura para alcanzar los 50 µL

por individuo, homogenice y finalmente distribuya el mix entre los tubos de PCR correspondientes a cada individuo. El volumen del mix a ser adicionado en cada tubo de PCR debe ser el suficiente para completar 50 μ L en cada uno de ellos.

Recuerde que la cantidad de agua ultrapura adicionada al mix para completar los 50 μ L de reacción individual, dependerá del volumen de ADN adicionado inicialmente por individuo, por lo cual recomendamos mantener una concentración de ADN homogénea entre los individuos envueltos en el experimento para facilitar el cálculo final de adición de agua ultrapura a la mezcla.

Lleve las reacciones de digestión/ligación al termociclador y sométalos al siguiente ciclo único:

37 °C por 2 h

68 °C por 15 (*killing*)

4 °C para siempre

Al cabo del ciclo de digestión, proceda a retirar los tubos y colóquelos a -20 °C hasta realizar el paso de PCR de verificación de funcionamiento de la digestión/ligación.

4. PCR de la digestión (test de verificación)

Este paso permite apenas verificar si la digestión del ADN y ligación de adaptadores se dieron correctamente.

Para la amplificación de fragmentos siga el protocolo de preparación del mix de PCR que se presenta a continuación:

5.25 μ L H₂O ultrapura

1.5 μ L buffer NH₄

1.5 μ L primer P1

1.5 μ L primer A-amp

1.5 μ L BSA

1.2 μ L dNTPs

1.2 μ L MgCl₂

0.35 μ L Taq ADN polimerasa

Volumen total: 15 μ L (14 μ L del mix + 1 μ L de la digestión/ligación)

Coloque las reacciones de PCR en termociclador siguiendo el siguiente ciclaje:

1 ciclo:

94 °C por 2 min

35 ciclos:

94 °C 15 segundos

55 °C 15 segundos

68 °C 90 segundos

1 ciclo:

4 °C por siempre

Tome 2 μL del producto de PCR de cada muestra y córralo por electroforesis (60 V por 1 hora) junto con el marcador molecular de tamaño Lambda/HindIII en gel de agarosa 1%, debiéndose observar un rastro o mancha de amplicones al final de la electroforesis como evidencia exitosa de la digestión/ligación (ver Figura 1).



Figura 1. Gel del test de amplificación de la digestión/ligación

Una vez verificado el éxito de la digestión/ligación, proceda a realizar la PCR de enriquecimiento de alta fidelidad.

5. PCR de enriquecimiento de alta fidelidad de la digestión/ligación (5 réplicas por muestra):

Después de la digestión/ligación la frecuencia teórica de fragmentos A-A, A-P1 y P1-P1 es 253, 2 y 1, respectivamente; siendo los fragmentos A-P1 los de nuestro interés. Para la selección de dichos fragmentos, realice una reacción de PCR de enriquecimiento de alta fidelidad a partir de la reacción de digestión/ligación considerando 5 réplicas por individuo. Las condiciones de amplificación deberán incluir lo siguiente:

11.44 μL H₂O ultrapura
2.0 μL MgCl₂
2.0 μL dNTPs
2.5 μL buffer (NH₄)₂SO₄
2.5 μL Primer P1
2.5 μL Primer A_amp
0.06 μL de KlenTaq (*High fidelity DNA polymerase*)
Volumen total: 25 μL (23 μL del mix + 2 μL de la digestión/ligación)

Proceda a llevar las reacciones al termociclador siguiendo el ciclaje a continuación:

1 ciclo:
68 °C por 60 segundos

18 ciclos:
93 °C por 10 segundos
52 °C por 35 segundos
68 °C por 90 segundos

1 ciclo:
68 °C por 7 min
10° C por siempre

El adaptador “A” tiene una cola “Y” divergente. La amplificación de los fragmentos vía PCR se da con los primers P1 y A_amp. La amplificación de fragmentos A-A no es posible debido a la presencia de la cola “Y”, la cual carece de región de anillamiento compatible con el primer A_amp (propio del adaptador “A”), necesitando de la formación de una cadena molde en el primer ciclo de PCR (solamente generado a partir del anillamiento del primer P1 en un *template* que incluye al adaptador P1) para generar amplicones en los ciclos siguientes (Davey & Blaxter 2011). Así, el adaptador “A” será únicamente completado en los fragmentos que están ligados con el adaptador “P1”, y por lo tanto, solamente aquellos fragmentos (A-P1) serán completamente amplificados (Ver Davey & Blaxter 2011). La formación de fragmentos P1-P1 es irrisoria, debido a la baja frecuencia del corte de la enzima SdaI (1 cada 65536 pares de bases), y por lo tanto una muy baja probabilidad de que éste permanezca intacto y que no ocurra un corte por la enzima de alta frecuencia Csp6I (1 cada 256 pares de bases) generando fragmentos A-P1. El objetivo de los 18 ciclos es disminuir la varianza en la representatividad de alelos generados por el sesgo de amplificación en una reacción por causa de la saturación al cabo de 35 ciclos.

Junte las réplicas de cada muestra (obteniendo un volumen final de 125 µL), tome una alícuota de 4 µL de cada muestra y proceda a la realización de una corrida electroforética (60 V por 1 hora) en gel de agarosa 1% junto con el marcador molecular de tamaño Lambda/HindIII. Posterior a la corrida, como evidencia del éxito del procedimiento, deberá observar un rastro de fragmentos continuos en una faja de tamaños variables (ver Figura 2).

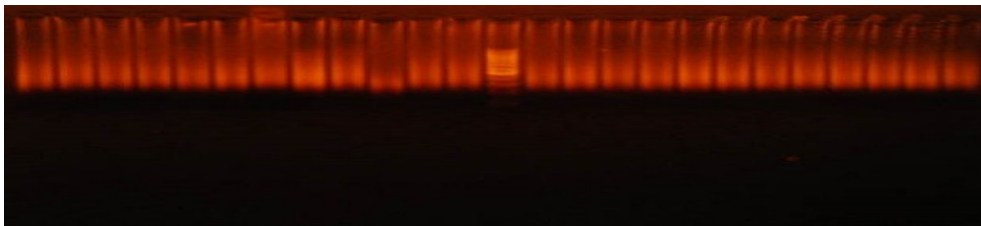


Figura 2. Gel de la biblioteca enriquecida (mix de las 5 réplicas)

Proceda a purificar las muestras y resuspenda en 40 µL de agua ultrapura. Para ello, siga el siguiente procedimiento:

Purificación de la biblioteca enriquecida – AmPure beads

- Adicionar la cantidad correcta de AMPure Beads a la biblioteca – **0.8 µL** de *AmPure beads* por cada 1 µL de producto – y agitar el tubo manualmente (p.e. con el dedo índice) hasta homogenizar la muestra.
- Incubar por 5 minutos a temperatura ambiente
- Colocar los tubos en la gradilla magnética e incubar por 5 minutos a temperatura ambiente.

- d. Remover el sobrenadante.
- e. Lavar las *beads* adicionando 500 μL de alcohol 80% (v/v).
- f. Remover el tubo de la gradilla magnética y agitarlo manualmente como en el paso “a”.
- g. Colocar el tubo de vuelta en la gradilla magnética e incubar por 5 minutos a temperatura ambiente.
- h. Remover el sobrenadante.
- i. Repetir los pasos “e” al “h” y continuar con el “j”.
- j. Dejar los tubos abiertos para secar por 10 - 15 minutos. No secar en exceso.
- k. Resuspender en X μL (p.e. 61.5 μL) de agua y mezclar.
- l. Incubar el tubo fuera de la gradilla magnética por 1 minuto a temperatura ambiente.
- m. Colocar el tubo de vuelta en la gradilla magnética e incubar por 2 minutos.
- n. Remover (X-1.5) μL del sobrenadante (p.e. 60 μL) y transferirlos para un tubo nuevo.

2. Cuantificación de las muestras y mezcla equimolar

- Cuantificar en el fluorímetro Qubit® 2.0 (Thermo Fisher Scientific)
- Seguir las instrucciones del fabricante
- Colocar 5 μL de la muestra junto con 195 μL de la solución de trabajo Qubit® en tubo de 0.1 mL suministrado en el kit del fluorímetro.
- Vortexar todos los tubos por 2-3 segundos
- Incubar a temperatura ambiente por 2 minutos
- Realizar lectura de la concentración de las muestras en el fluorímetro Qubit® 2.0

Opción: **DNA – dsDNA HS** (*double-stranded DNA High Sensitivity* [10 pg/ μL a 100 ng/ μL] - si es este kit) – **Read new standards** (Leer Standard 1 y Leer Standard 2) – **Leer muestra.**

****Importante:** el primer valor que aparece en la lectura del Qubit® 2.0 corresponde a la concentración de la muestra en el tubo, cuyas unidades son ng/mL. Para calcular la concentración original de la muestra es necesario ir a la opción **Calculate Stock Conc.** y después ajustar el volumen de la muestra usado para la lectura. Finalmente, es muy importante escoger las unidades correctas para posteriores cálculos (**ng/ μL**). Ese último valor debe ser guardado para cada una de las muestras cuya concentración es estimada.

Junte equimolarmente todas las muestras (individuos) en un solo tubo eppendorf de 1.5 mL de forma que todos los individuos queden representados por una misma cantidad de ADN dentro de la mezcla. Para ello, tome como base del cálculo la concentración de la muestra cuantificada en el Qubit® 2.0. Tenga en cuenta que la máxima cantidad de producto de PCR final en la mezcla debe ser 4 μg = 4000ng).

Opcional: Posteriormente, si lo requiere, puede concentrar la biblioteca en Speedvac y después proceder a la purificación de la muestra.

3. Purificación de la biblioteca – AmPure beads

- a. Adicionar la cantidad correcta de AMPure Beads a la biblioteca – **0.8 μ L** de *AmPure beads* por cada 1 μ L de producto – y agitar el tubo manualmente (p.e. con el dedo índice) hasta homogenizar la muestra.
- b. Incubar por 5 minutos a temperatura ambiente
- c. Colocar los tubos en la gradilla magnética e incubar por 5 minutos a temperatura ambiente.
- d. Remover el sobrenadante.
- e. Lavar las *beads* adicionando 500 μ L de alcohol 80% (v/v).
- f. Remover el tubo de la gradilla magnética y agitarlo manualmente como en el paso “a”.
- g. Colocar el tubo de vuelta en la gradilla magnética e incubar por 5 minutos a temperatura ambiente.
- h. Remover el sobrenadante.
- i. Repetir los pasos “e” al “h” y continuar con el “j”.
- j. Dejar los tubos abiertos para secar por 10 - 15 minutos. No secar en exceso.
- k. Resuspender en X μ L (p.e. 41.5 μ L) de agua y mezclar.
- l. Incubar el tubo fuera de la gradilla magnética por 1 minuto a temperatura ambiente.
- m. Colocar el tubo de vuelta en la gradilla magnética e incubar por 2 minutos.
- n. Remover (X-1.5) μ L del sobrenadante (p.e. 40 μ L) y transferirlos para un tubo nuevo.

2. Selección de fragmentos por tamaño

IonTorrent PGM permite el secuenciamiento de fragmentos de hasta 400 pares de bases utilizando el chip 318 Ion PGM (producción teórica de 5 millones de lecturas por corrida). El cálculo de la faja de corte más adecuada (considerando la mayor cobertura alélica por individuo representado en la biblioteca genómica) debe ser hecho conforme indicado en el artículo a través de simulaciones *in-silico* con genomas de referencia de especies filogenéticamente próximas.

La selección de fragmentos es realizada a través del sistema Pippin Prep (Sage Science) utilizando casetes de agarosa 2% *dye-free*, *internal standard mix* y *marker L*. Para observar los detalles del método, siga el manual ofrecido por los fabricantes del sistema. Algunos datos del procedimiento son mencionados a continuación.

- Muestra de ADN → 30 μ L de la muestra (biblioteca) + 10 μ L de la solución del marcador L ofrecido por el sistema Pippin Prep.
- Programe el protocolo en el sistema → Cassete 2% DF Folder L; Tight o Range (média = \pm 400).
- Calibrar el Pippin Prep colocando la placa de calibración en el nido óptico (LED target1: 0.80).

- Revisar el casete → Verifique que el nivel del buffer en todos los pozos esté alto, columnas de gel intactas y sin formación de burbujas en su interior.
- Preparar el casete para la corrida → retire las burbujas contenidas en el buffer; coloque el casete en el nido óptico; remueva las cintas adhesivas; remueva el buffer de los módulos de “elución” y coloque 40 µL del buffer de electroforesis en su lugar; coloque una cinta para tapar los módulos de “elución”; checar el nivel de buffer en los pozos de las muestras; comenzar el TEST de verificación. Si todas las condiciones para la corrida en el casete estuvieren bien, aparecerá el mensaje PASS en la pantalla como indicador).
- Cargue las muestras → antes verifique nuevamente el nivel del buffer en los pozos de las muestras; remueva 40 µL del buffer del pozo de su elección y cargue 40 µL de la muestra+marcador preparada anteriormente.
- Ejecute la corrida → Cierre la tapa, ir al menú principal y escoger el programa e iniciar: START. La corrida se detiene automáticamente cuando la corrida y posterior colecta de los fragmentos en la faja deseada es completada.
- Después de la corrida → remueva la muestra (~40 µL) usando pipeta de 100-200 µL (la muestra está en buffer Tris-TAPS. No dejar *overnight*); remueva el casete y disponga de la muestra apropiadamente.

El tiempo de corrida estimado puede variar según el tamaño de los fragmentos a ser colectados (ver Tabla 1).

Tabla 1. Tamaño de los fragmentos seleccionados y su relación con el tiempo estimado de corrida hasta su colecta automática en el Pippin Prep.

<i>Target (bp)</i>	<i>Time to collect (min)</i>
100	49
200	57
300	63
400	71
500	79

2. Purificación de la fracción de la biblioteca colectada – AmPure beads

- a. Adicionar la cantidad correcta de AMPure Beads a la biblioteca – **0.7 μ L** de las *beads* por cada 1 μ L de producto y agitar el tubo manualmente hasta homogenizar (p.e. con el dedo).
- b. Incubar por 5 minutos a temperatura ambiente.
- c. Colocar el tubo en la gradilla magnética e incubar por 5 minutos a temperatura ambiente.
- d. Remover el sobrenadante.
- e. Lavar las *beads* adicionando 500 μ L de alcohol 80% v/v.
- f. Remover el tubo de la gradilla y agitar el tubo manualmente hasta homogenizar (p.e. con el dedo).
- g. Colocar el tubo de vuelta en la gradilla e incubar por 5 minutos.
- h. Remover el sobrenadante.
- i. Repetir los pasos “e”-“h” y continuar en el paso “j”
- j. Dejar los tubos abiertos para secar por 10-15 minutos. No secar en exceso.
- k. Resuspender en X μ L (p.e. 24.5 μ L) de agua y mezclar.
- l. Incubar fuera de la gradilla magnética por 1 minuto.
- m. Colocar el tubo en la gradilla magnética e incubar por 2 minutos.
- n. Remover (X-1.5) μ L del sobrenadante (p.e. 23 μ L) y transferir para un tubo nuevo.

2. Cálculo del volumen de la biblioteca para preparación del *template*

- Cuantificar la biblioteca en el Qubit® 2.0 colocando 3 μ L de cada muestra y 197 μ L de la solución de trabajo del kit.
- La concentración original de la muestra, dada en **ng/ μ L**, será usada para calcular el volumen de la biblioteca usada para preparación del *template*.
- Use la planilla de Excel **nM Conversion Calculator** sugerida por los fabricantes de IonTorrent (técnicos de aplicación) para realizar el cálculo de la dilución y obtención del número de fragmentos a ser tomados en determinado volumen de la biblioteca.

Ej: Biblioteca: 0.231 ng/ μ L

1ª dilución (50 pM, 50 μ L): 2.73 μ L de la biblioteca + 47.27 μ L de H₂O

2ª dilución (15 pM, 25 μ L): 7.50 μ L da 1ª dilución + 17.5 μ L de H₂O

3. Preparación del *template* (ver **User Guide Ion PGM Hi-Q OT2 Kit**)
4. Enriquecimiento (ver **User Guide Ion PGM Hi-Q OT2 Kit**)
5. Secuenciamiento - Chip Ion 318 v2 (ver **User Guide Ion PGM Hi-Q Sequencing Kit**)