

SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO – ddRAD-TAGS ADAPTADO PARA ION TORRENT

I. Extração de DNA:

- Quantificar as amostras e fazer o cálculo para obter 200 ng de cada amostra
- Fazer um gel para verificar que o DNA tenha boa qualidade

*Preparação dos adaptadores

-Todos os AY para 10 µM	-Apenas P1 para 5 µM
10 µl do estoque A (100 µM)	5 µl do estoque P1-SdaI (100 µM)
10 µl do estoque Y (100 µM)	5 µl do estoque P1-RC (100 µM)
0,8 µl de 5M NaCl	0,8 µl de 5M NaCl
79,2 µl de TE 1X	89,2 µl de TE 1X
Total: 100 µl	Total: 100 µl

Programa de termociclagem: *linkers*

95°C	3 min
65°C	2 min
55°C	2 min
45°C	2 min
35°C	2 min
25°C	2 min
15°C	1 min
4°C	∞

*Diluição dos adaptadores

-Adaptador AY (10 µM)	-Adaptador P1 (5 µM)
29,59 µl do estoque AY (10 µM)	1,39 do estoque P1 (5 µM)
20,41 µl de TE 1X	148,61 µl de TE 1X
Total: 50 µl	Total: Total: 150 µl

II. Digestão e ligação:

1,0 µl DNA 200 ng*

**individual*

2,0 µl adaptador AY diluído*

38,8 µl H₂O

5,0 µL buffer TANGO

2,0 µl adaptador P1 diluído

0,1 µl enzima de restrição SdaI

0,1 µl enzima de restrição Csp6I

0,5 µl T4 ligase

0,5 µl de ATP

Total: 50 µl

Programa de termociclagem: *digest37*

37°C	3 hr
68°C	15 min
4°C	∞

III. PCR da digestão (teste):

5,25 µl H₂O

1,5 µL buffer NH₄

1,5 µl primer P1

1,5 µl primer A-amp

1,5 µl BSA

1,2 µl dNTPs

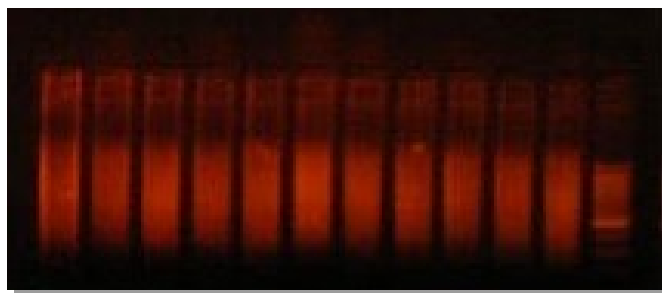
1,2 µl MgCl₂

0,35 µl Taq

Total: 15 µl (14 µl + 1 µl da digestão/ligação)

Programa: **SNP Pre-amp** (Biorad1 e 2)

94°C	2 min	} 35x
94°C	15 seg	
55°C	35 seg	
68°C	90 seg	
4°C	∞	



Gel da amplificação da digestão/ligação

IV. PCR da digestão (4 réplicas x AMOSTRA):

11,44 µl H₂O

2,0 µl MgCl₂

2,0 µl dNTPs

2,5 µl buffer NH₄

2,5 µl Primer P1

2,5 µl Primer A-amp

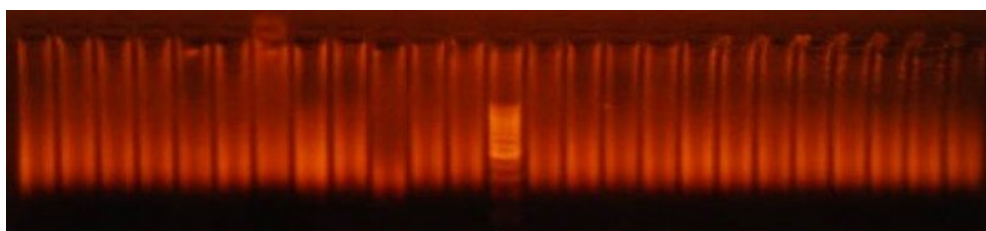
0,06 µl KlenTaq

Total: 25 µl (23 µl + 2 µl da digestão/ligação)

Programa: **PCR_digest_ion**

68°C	60 seg	} 18x
93°C	10 seg	
52°C	35 seg	
68°C	90 seg	
68°C	7 min	

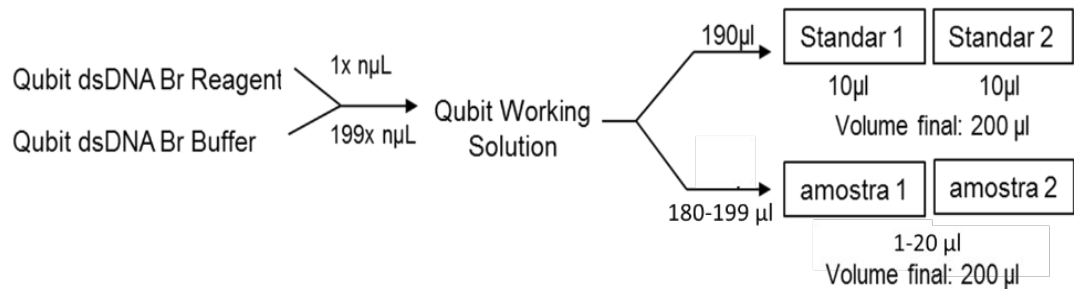
- Juntar as réplicas de cada amostra e fazer o gel



Gel da amplificação da digestão/ligação

V. Quantificação das amostras:

- Quantificar no fluorômetro Qubit® 2.0 (Thermo Fisher Scientific)
- Seguir o protocolo do fabricante



- Colocar 5 µl de cada amostra e 195 µl da solução de trabalho
- Vortexar todos os tubos por 2-3 segundos
- Incubar em temperatura ambiente por 2 minutos
- Ler os tubos no Qubit

Opção: **DNA – dsDNA HS** (doble-stranded DNA High Sensitivity [10 pg/µl a 100 ng/µl] - se for esse kit) –

Read new standards (Ler Standard 1 e Ler Standard 2) – **Ler amostra**



****Importante:** o primeiro valor que aparece na leitura do Qubit corresponde à concentração da amostra no tubo cujas unidades são ng/mL. Para calcular a concentração original da amostra é necessário ir na opção **Calculate Stock Conc.** e depois ajustar o volume de amostra usado para a leitura. Por fim, é muito importante escolher as unidades certas para posteriores cálculos que são **ng/µL**. Esse último valor deve ser salvo para cada uma das amostras.

- Juntar todos os indivíduos em um tubo só de maneira equimolar (mesma quantidade de DNA), levando em consideração a quantificação feita no Qubit (máxima quantidade PCR fragment 4ng=4000ng).
- Posteriormente, **se for necessário** pode concentrar a biblioteca no Speedvac.

VI. Purificação da biblioteca – AmPure Purification

1. Adicionar a quantidade correta de AMPure Beads à biblioteca – **0,8 μ l** das beads para cada 1 μ l de produto e mexer o tubo com o dedo
2. Incubar por 5 minutos a temperatura ambiente
3. Colocar os tubos na rack magnética e incubar por 5 minutos a temperatura ambiente
4. Remover o sobrenadante
5. Lavar as beads adicionando 500 μ l de álcool 80%
6. Remover o tubo da rack e mexer o tubo com o dedo
7. Colocar o tubo de volta na rack e incubar por 5 minutos
8. Remover o sobrenadante
9. Repetir os passos 5-8 e continuar no 10
10. Deixar os tubos abertos para secar por 10-15 minutos. Não secar em excesso
11. Ressuspender em X μ l (p.e. 61,5 μ l) de água e misturar
12. Incubar fora da rack magnética por 1 minuto
13. Colocar o tubo na rack magnética e incubar por 2 minutos
14. Remover (X-1,5) μ l (p.e. 60 μ l) do sobrenadante e transferir para um tubo novo

VII. Seleção de tamanho:

Pippin Prep (com cassetes de agarose 2% dye-free, internal standard mix, marker L)

- Amostra de DNA → 30 μ l da amostra + 10 μ l da solução do marcador.
- Programar o protocolo → Cassete 2% DF Folder L; Tight ou Range (média = \pm 400).
- Calibrar o Pippin Prep colocando a placa de calibração no ninho óptico (LED target1: 0,80).
- Revisar o cassete → O nível de buffer em todos os poços, colunas de gel e formação de bolhas.



- Preparar o cassete para a corrida → Tirar bolhas; colocar cassete no ninho óptico; remover as fitas adesivas; remover o buffer dos módulos de “elution” e colocar 40 µl do buffer de eletroforese; colocar a fita para tampar os módulos de “elution”; checar o nível de buffer nos poços das amostras; começar o TEST (se tudo estiver Ok aparecerá PASS).
- Carregar as amostras → verificar novamente o nível de buffer nos poços das amostras; remover 40 µl do buffer de um dos poços e carregar 40 µl da amostra preparada anteriormente.
- Corrida → fechar a tampa, ir ao menu principal e escolher o programa e START. A corrida para automaticamente quando a coleta da amostra é completada.
- Fração coletada → remover a amostra (~40 µl) usando pipeta de 100-200 µl (a amostra está em buffer Tris-TAPS. Não deixar overnight); remover o cassete e dispor dele apropriadamente.

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

VIII. Purificação da biblioteca – AmPure Purification

1. Adicionar a quantidade correta de AMPure Beads à biblioteca – **0,7 µl** das beads para cada 1 µl de produto e mexer o tubo com o dedo
2. Incubar por 5 minutos a temperatura ambiente
3. Colocar os tubos na rack magnética e incubar por 5 minutos a temperatura ambiente
4. Remover o sobrenadante
5. Lavar as beads adicionando 500 µl de álcool 80%
6. Remover o tubo da rack e mexer o tubo com o dedo
7. Colocar o tubo de volta na rack e incubar por 5 minutos
8. Remover o sobrenadante
9. Repetir os passos 5-8 e continuar no 10
10. Deixar os tubos abertos para secar por 10-15 minutos. Não secar em excesso
11. Ressuspender em X µl (p.e. 24,5 µl) de água e misturar
12. Incubar fora da rack magnética por 1 minuto

13. Colocar o tubo na rack magnética e incubar por 2 minutos
14. Remover (X-1,5) μl (p.e. 23 μl) do sobrenadante e transferir para um tubo novo

IX. Cálculo do volume da biblioteca para preparação do *template*

- Quantificar a biblioteca no Qubit colocando 3 μl de cada amostra e 197 μl da solução de trabalho
- A concentração original da amostra dada em **ng/ μL** será usada para calcular o volume da biblioteca usada para preparação do *template*
- Usar planilha de Excel **nM Conversion Calculator** anexa para fazer o cálculo

Ex: Biblioteca: 0,231 ng/ μL

1ª diluição (50 pM, 50 μL): 2,73 μL da biblioteca + 47,27 μL de H_2O

2ª diluição (15 pM, 25 μL): 7,50 μL da 1ª diluição + 17,5 μL de H_2O

X. Preparo do *template* (ver User Guide Ion PGM Hi-Q OT2 Kit)

XI. Enriquecimento (ver User Guide Ion PGM Hi-Q OT2 Kit)

XII. Sequenciamento - Chip Ion 318 v2 (ver User Guide Ion PGM Hi-Q Sequencing Kit)