

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
GENOOMIKA INSTITUUT

DNA eraldamise ja genoomsete raamatukogude valmistamise metoodikate analüüs

erinevate bioarheoloogiliste materjalide alusel

Magistritöö

30 EAP

Helja Niinemäe

Juhendajad: prof Kristiina Tambets
dr Lehti Saag

TARTU 2023

DNA eraldamise ja genoomsete raamatukogude valmistamise meetodikate analüüs erinevate bioarheoloogiliste materjalide alusel

Lühikokkuvõte: Alates esimestest vana DNA töödest on arheogenoomika teinud läbi suure arengu. Lisaks luudele ja mumifitseerunud/kuivanud pehmetele kudedele saab geneetilist informatsiooni sulgedest, koproliididest, pinnasest, munakoortest jne. Kuna erinevatest bioarheoloogilistest materjalidest on DNA eraldamine erinev, on vaja DNA ekstraheerimise ja sekveneerimisraamatukogude loomise meetodikaid pidevalt täiustada, et väärtuslikku materjali maksimaalselt, kuid säästvalt kasutada. Käesolevas töös testiti kommertslike ning eelkõige kaasaegsete materjalide käsitlemiseks mõeldud ekstraheerimiskomplektide protokollide tingimusi erinevat päritolu bioarheoloogilisel materjalil ning leiti, et keskaegsetest nahaproovidest DNA ekstraheerimiseks valitud erinevad lüüsimisajad statistiliselt olulisi erinevusi ei andnud. Samas leiti, et keskaegse kuivanud koproliidiproovi koguse vähendamine tõstis tuntavalt DNA saagist ekstraktis. Genoomsete sekveneerimisraamatukogude loomise protokollide võrdlemisel leiti, et uus nn ühe tuubi protokoll kaasas pikemaid DNA fragmente, kuid rohkem PCR-i duplikaate, kui tavaprotokoll.

Märksõnad: vana DNA, arheogenoomika, DNA eraldamine, genoomsed raamatukogud

CERCS: B220 Geneetika, tsütogeneetika, H340 Arheoloogia

Analysis of DNA isolation and genomic library preparation methodologies based on various bioarchaeological materials

Abstract: Since the first ancient DNA studies, archaeogenomics has developed greatly. In addition to bones and mummified/dried soft tissues, genetic information can be obtained from feathers, coprolites, soil, eggshells, etc. Since the isolation of DNA is different for each material, it has been necessary to improve extraction and library preparation methods in order to obtain maximum amount of information from valuable bioarchaeological material. This work examines the suitability of protocols for different source materials. Testinging the conditions of commercial extraction kits showed that different lysis times for DNA extraction from medieval skin samples did not give statistically significant differences, but reducing the amount of medieval dried coprolite sample increased the DNA content in the obtained extract. When comparing genomic library preparation methods, it was seen that the new tested one-tube protocol included longer fragments, but also more PCR duplicates.

Keywords: ancient DNA, archaeogenomics, DNA extraction, genomic libraries

CERCS: B220 Genetics, Cytogenetics, H340 Archaeology

Sisukord.

Kasutatud lühendid.	5
Sissejuhatus.	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	7
1.1. Mis on vana DNA? Lühiülevaade arheogenoomika arengust.	7
1.2. Vana DNA-ga töötamise töövoog.	9
1.2.1. Vana DNA materjalid ja allikad.	12
1.2.2. Vana DNA raamatukogude protokollide arengud.	14
2. EKSPERIMENTAALOSA	16
2.1. Töö eesmärgid	16
2.2. Materjal ja meetoodika	17
2.2.1 Arheoloogiline materjal vana DNA analüüsiks	17
2.2.1.1 Hambad	17
2.2.1.2 Hambakivi	17
2.2.1.3 Nahk	18
2.2.1.4 Koprolit	18
2.2.1.5 Pinnas	19
2.2.2 Materjali andmete kataloogimine	19
2.2.3 Materjali proovistamine	19
2.2.3.1 Ruumi ja tööpinna ettevalmistamine proovistamiseks	20
2.2.3.2 Materjali proovistamine	21
2.2.3.2.1 Hambad	21
2.2.3.2.2 Hambakivi	21
2.2.3.2.3 Nahk	22
2.2.3.2.4 Koprolit	23
2.2.3.2.5 Pinnas	23
2.2.4 DNA ekstraheerimine, ekstraktide puhastamine ja ettevalmistamine raamatukogude loomiseks	24
2.2.4.1 Hambad	24
2.2.4.2 Hambakivi	25
2.2.4.3 Nahk	26
2.2.4.4 Koprolit	27
2.2.4.5 Pinnas	29
2.2.5 DNA ekstraktide kontsentratsiooni mõõtmine	30
2.2.6 DNA raamatukogude loomine	30
2.2.6.1 TÜ GI vana DNA labori tavaprotokoll (Meyer & Kircher, 2010).	31
2.2.6.2 BEST protokoll	32
2.2.6.2.1 Algne BEST protokoll (Carøe et al., 2017b)	32
2.2.6.2.2 BEST protokoll modifitseerimine	34
2.2.6.2.3 Genoomsete raamatukogude valmistamise protokollide võrdlus	40
2.2.6.2.4 Adapterite segu valmistamine	42

2.2.6.2.5 Reaktsioonivõimendi valmistamine	43
2.2.6.2.6 Reamplifitseerimine	43
2.2.6.2.7 PCR produkti puhastamine AMPure kerakestega	43
2.2.7 DNA raamatukogude kontsentratsiooni ja fragmentide pikkuste mõõtmine	45
2.2.8 DNA Sekveneerimine	45
2.2.9 Bioinformaatiline analüüs.....	46
2.2.9.1 Järjestuste ettevalmistamine ja referentsile joondamine	46
2.2.9.2 Järjestuste in silico kvaliteedikontroll	47
2.3 Tulemused ja arutelu	48
2.3.1 Uute materjalide ekstraheerimisprotokollide optimeerimise tulemused	48
2.3.1.1 Qiagen Blood&Tissue kit.....	48
2.3.1.2 Qiagen DNeasy PowerFeces Pro Kit	49
2.3.2 Uuritavate proovide kvaliteet ja sekveneerimise tulemused	50
2.3.2.1 Inimese järjestuste analüüs	51
2.3.2.2 Metagenoomsed analüüsid	52
2.3.3 TÜ GI vana DNA labori Meyer & Kircher protokoll ja modifitseeritud BEST protokoll võrdlus.....	53
Kokkuvõte	57
Summary.....	59
Tänuõnad.....	61
Kirjanduse loetelu.....	62
Kasutatud veebiaadressid	76
Lisad.....	77
Lihtlitsents	88

Kasutatud lühendid.

AF	– adapterite otste täitmine, ingl k <i>Adapter Fill-in</i>
AL	– adapterite ligeerimine, ingl k <i>Adapter Ligation</i>
AMP	– AMPure XP kerakesed, ingl k <i>AMPure XP Beads</i>
ap	– aluspaar
BEST	– tõmpide otste ühetuubiline (protokoll), ingl k <i>Blunt End Single Tube protocol</i>
BSA	– veise seerumi albumiin, ingl k <i>Bovine Serum Albumin</i>
C>T	– tsütosiini asendumine tümiiniga sekveneeritud järjestustes
EDTA	– etüleendiamiintetraädikhape, ingl k <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
ER	– DNA fragmentide otste täitmine, ingl k <i>End Repair</i>
GI	– genoomika instituut
HEPA filter	– kõrge efektiivsusega tahkete osakeste õhufilter, ingl k <i>high efficiency particulate air filter</i>
M&K	– Meyer ja Kircher raamatukogu protokoll
MDS	– multidimensionaalne skaleerimine
mtDNA	– mitokondriaalne DNA
NGS	– teise põlvkonna sekveneerimine, ingl k <i>Next-generation sequencing</i>
PCR	– polümeraasi ahelreaktsioon, ingl k <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PE	– mõlemast otsast, ingl k <i>paired-end</i>
rpm	– pööret minutis, ingl k <i>revolutions per minute</i>
TÜ	– Tartu Ülikool
UDG	– uratsiil DNA glükosülaas, ingl k <i>Uracil DNA glycosylase</i>
USER	– uratsiilspetsiifiline väljalõikereagent, ingl k <i>Uracil-Specific Excision Reagent</i>

Sissejuhatus.

Arheogenoomika on suhteliselt uus ja kiiresti arenev teadusharu, kus uut informatsiooni kunagi toimunud sündmuste, elanud liikide ja ka haiguste leviku kohta lisandub igapäevaselt. Uusi andmeid saadakse üha erinevamaid bioarheoloogilisi materjale kasutades ja nende tarvis on vaja leida väärtuslikku materjali võimalikult vähe kahjustavaid ning säästlikke meetodeid DNA eraldamiseks ning saadud ekstraktide töötlemiseks enne DNA sekveneerimist ja bioinformaatilisi analüüse.

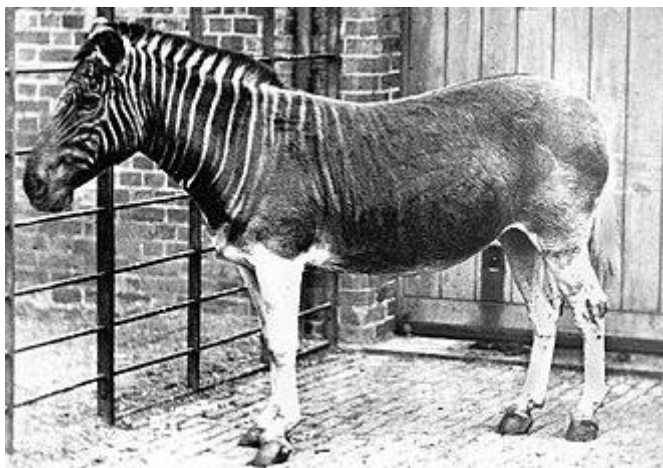
DNA eraldamiseks on loodud hulgaliselt kommertslikke reagentide komplekte, millest enamik on välja töötatud tänapäevaste proovide käsitlemiseks. Selleks, et kasutada neid vana DNA materjalidel, tuleb neid enne kasutusele võtmist testida ning vajadusel ka optimeerimiseks modifitseerida, kuna vanal DNA-l on tänapäeval elavatest organismidest eraldatud DNA-ga võrreldes mitmeid eripärasid. Lisaks on tekkinud vajadus ka paremate sekveneerimisraamatukogude valmistamise meetodite järele, mis kasutaksid kogu proovist eraldatud DNA, sõltumata selle kvaliteedist ja vormist, ning seetõttu täiustatakse neid uut päritolu bioarheoloogiliste proovide lisandudes pidevalt.

Käesolev töö viidi läbi Tartu Ülikooli genoomika instituudi Eesti biokeskuse vana DNA puhaslaboris. Esimeseks eesmärgiks oli uurida kolme kommertsiaalselt väljatöötatud DNA eraldamise meetodi sobivust kolmel uuel bioarheoloogilisel materjalil (nahk, koproliit ja pinnas). Selleks hinnati komplektide käsiraamatute protokollide sobivust ning optimeeriti neid sõltuvalt materjali eripäradest. Teiseks ülesandeks oli hinnata kahe samaaegselt läbi viidud genoomse raamatukogu valmistamise protokollide mõju sekveneerimistulemustele ning hinnata nende alusel loodud sekveneerimisraamatukogude kvaliteeti.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Mis on vana DNA? Lühüülevaade arheogenoomika arengust.

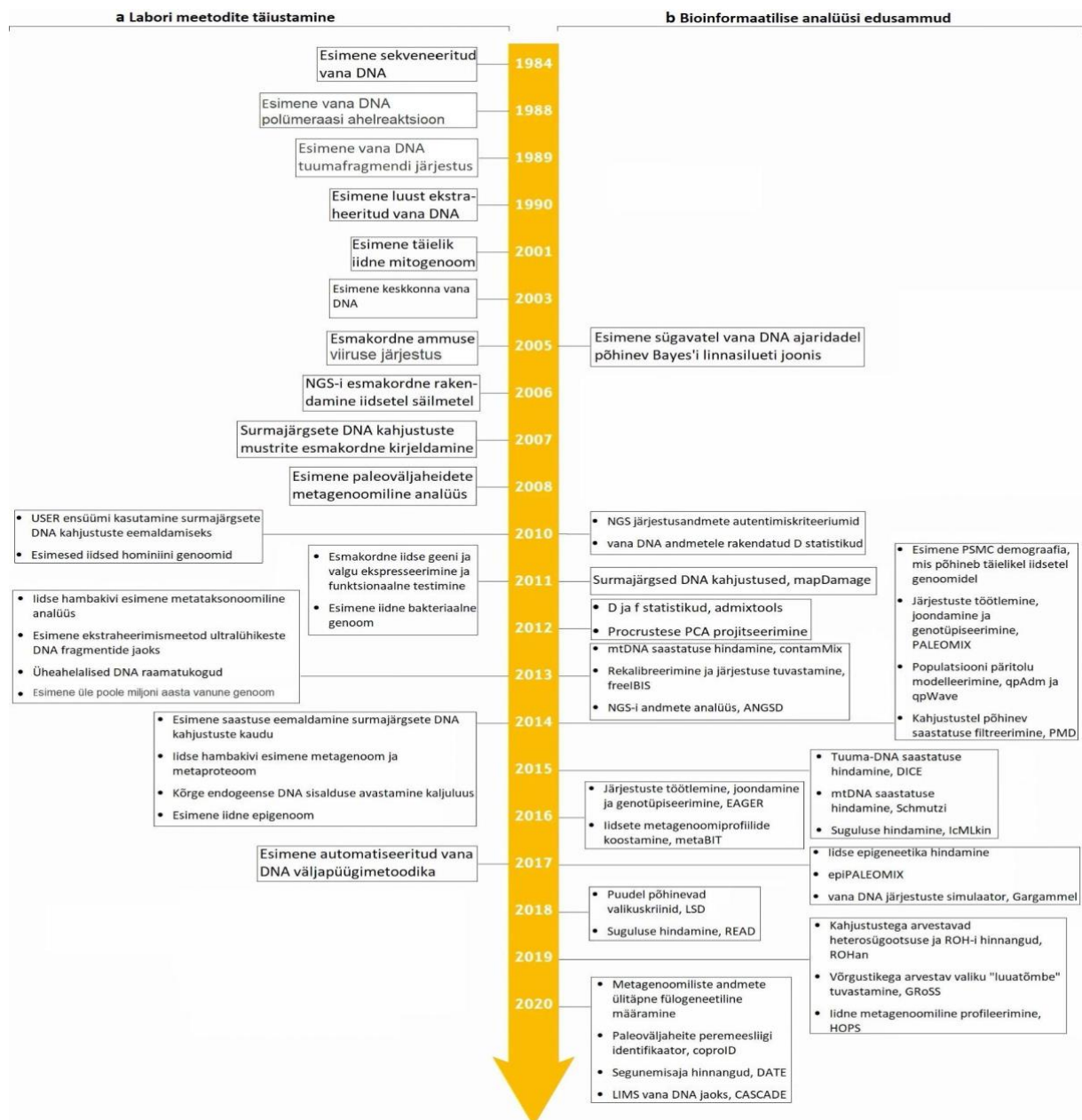
Vanaks DNA-ks (ingl k *ancient DNA*, *aDNA*) loetakse subfossiilses materjalis – näiteks luud, hambad, teokarbid, setted, juuksed ja mumifitseerunud nahk – säilinud pärilikkusainet. Võrreldes elavate organismide geneetilise materjaliga on vana DNA surmajärgsete lagunemisprotsesside tõttu kahjustunud ja fragmenteerunud (Orlando et al., 2021). On leitud, et teoreetiliselt võivad lühikesed DNA fragmendid säilida väga pikka aega: koostatud mudeli järgi on luuproovi 30 aluspaari (ap) pikkuse mitokondriaalse DNA (mtDNA) fragmendi poolestusaeg -5 °C juures 158 000 aastat ning lähtudes sellest võib öelda, et sekveneeritavad DNA fragmendid võivad külmunud keskkonnas säilida rohkem kui miljon aastat (Allentoft et al., 2012). Samas sõltub see paljudest erinevatest teguritest, nagu orgaanilise materjali päritolu, temperatuur, niiskus ja päikesevalgusele eksponeeritus (Allentoft et al., 2012). Esimene fragment vana DNA molekulist ekstraheeriti ja sekveneeriti 1984. aastal. Selleks kasutati muuseumis eksponeeritud 20. sajandi alguses välja surnud sebraliigi quagga (*E. quagga quagga*) kuivanud lihaskudet. Andmeid saadi vaid mtDNA 229 ap kohta (Higuchi et al., 1984), kuid see töö andis tõuke uue teadusharu – arheogenoomika – arenguks.



Joonis 1. *Equus quagga quagga*. Esimene vana DNA fragment ekstraheeriti ja sekveneeriti surnud sebraliigi *Equus quagga quagga* kuivanud lihaskoest. (https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/d/d2/Quagga_photo.jpg/330px-Quagga_photo.jpg)

Sellest ajast on vana DNA uurimise tehnoloogiad jõudsalt edasi arenenud. Vanimad proovid, millest eraldatud DNA-d kunagi sekveneeritud on, pärinevad hetkel Ida-Siberist leitud rohkem kui 1 miljon aastat vanadelt mammutitelt (van der Valk et al., 2021) ning 2 miljoni aasta vanustest Põhja-Gröönimaal asuva Kap København setetest (Kjær et al., 2022).

Kõige esimese vana DNA sekveneerimise ja viimati mainitud vanimate sekveneeritud proovide vahele on mahtunud palju avastusi ja mitmete nüüdseks kadunud liikide genoomid on täielikult sekveneeritud, näiteks mammuti (Palkopoulou et al., 2015) ja koopakaru (Barlow et al., 2018) omad. Selleks, et uuritavast materjalist saaks sobivat infot, mille alusel oleks võimalik varasemate isendite, populatsioonide ja liikide geneetiliste variatsioonide mustreid tõlgendada, on vaja läbi viia hulgaliselt erinevaid spetsiaalseid laboratoorseid ja bioinformaatilisi analüüse (Orlando et al., 2021). Joonisel 2 on toodud tähtsamad verstapostid arheogenoomika arengus.



Joonis 2. Vana DNA analüüsi tähtsamad verstapostid. (a) Laboratoorsete meetodite täiustamine; (b) Bioinformaatilise analüüsi edusammud (Orlando et al., 2021).

Tänu meetodite täiustamisele ja saadud andmetele on lahendatud terve hulk küsimusi nii antropoloogias, evolutsioonibioloogias kui ka keskkonna- ja arheoloogiateadustes, see on muutnud paljuski meie arusaama suurtest eelajaloolistest ja ajaloolistest sündmustest ning näidanud märkimisväärselt dünaamilisemat minevikku, kui varem hinnatud (Orlando et al., 2021). Inimese sugupuusse on lisandunud uusi harusid, näiteks denisi inimesed, kes on neandertaallaste lähisugulased (Krause et al., 2010; Meyer et al., 2012; Reich et al., 2010) ning kelle olemasolust enne vana DNA uuringuid midagi teada ei olnud. Samuti on need andmed täiendanud meie teadmisi võimalike väljasuremiste põhjustest (Fortes et al., 2016; Gretzinger et al., 2019; Lorenzen et al., 2011; Orlando ja Cooper, 2014; Willerslev et al., 2014) ja laiendanud meie arusaama nakkushaiguste tekkest, virulentsusest ning levikust (Key et al., 2020; Spyrou et al., 2019; Warinner et al., 2014).

Vana materjali käitlemise temaatika on mitmel põhjusel tundlik – põhjused võivad olla nii sotsiaalsed, poliitilised kui ka füüsilised, sest analüüsi läbiviimine võib subfossiilse materjali täielikult hävitada, mille tõttu kaob jäädavalt osa inimkonna ühisest biokultuurilisest pärandist (Orlando et al., 2021). Vältimaks eetilisi vastuolusid ja soodustamaks kultuuripärandi vastutustundlikku kasutamist tuleb aegsasti konsulteerida kõikide huvigruppidega, sh kohalike sidusrühmadega, ning vana DNA uuringuid hoolikalt planeerida (Alpaslan-Roodenberg et al., 2021; Ávila-Arcos et al., 2022; Cameron, 2021; Orlando et al., 2021; Prendergast ja Sawchuk, 2018).

1.2. Vana DNA-ga töötamise töövoog.

Uusi labori- ja andmete analüüsimeetodeid on lisandunud viimase kümnendi jooksul rohkesti (Orlando et al., 2021). Iga uus materjal on toonud kasutusele uusi ekstraheerimismeetodeid ning järjest on täiustatud genoomsete raamatukogude loomise protokolle (Orlando et al., 2021). Meetodite täiustamise üks eesmärk on võtta kasutusele materjali säästvaid meetodikaid (Harney et al., 2020; Patzold et al., 2020; K. A. Sirak et al., 2017; Sugita et al., 2020).

Kõik laboratoorse töö etapid nagu proovi ettevalmistus, DNA ekstraheerimine, puhastamine ning DNA raamatukogu loomine, viiakse läbi spetsiaalsetes vana DNA puhastamiskambrites, et minimeerida proovide saastumist (Fulton ja Shapiro, 2019; Orlando et al., 2021). Vana DNA laborite ventilatsioon on varustatud kõrge efektiivsusega tahkete osakeste õhufiltritega (HEPA filtritega), labori pindu töödeldakse regulaarselt UV-kiirguse, naatriumhüpokloriti ja nukleinhappeid hävitava lahusega (Fulton ja Shapiro, 2019; Orlando et al., 2021). Neis laboreis töötavad spetsiaalse väljaõppega teadlased kannavad ühekordseid isikukaitsevahendeid nagu

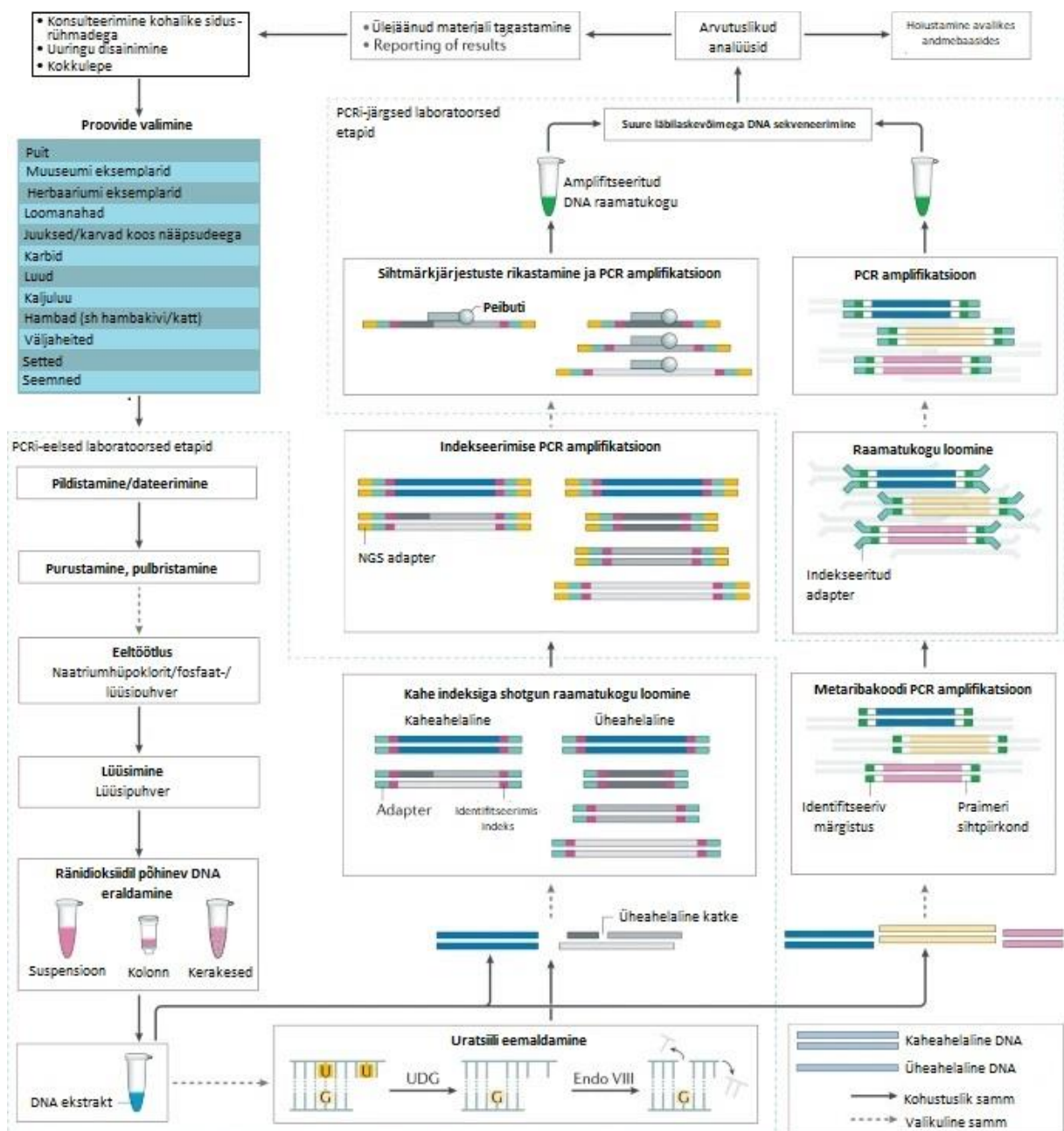
kogu keha katvad ülikonnad, kindad, varrukad, näomaskid, ning spetsiaalseid jalanõusid (Fulton ja Shapiro, 2019). Samuti on vana DNA labor jagatud erineva puhtuse astmega ruumideks vastavalt neis tehtava töö spetsiifikale (Fulton ja Shapiro, 2019).

Töövoog algab uuringute planeerimisega, mille käigus tuleks kaasata kõik huvigrupid, sellele järgneb proovide kogumine ja selle dokumenteerimine (Bardill et al., 2018; Orlando et al., 2021; Prendergast ja Sawchuk, 2018). Laborisse jõudnud proovid pildistakse ja kogu saadud info viiakse andmebaasi. Selleks, et proovid viia edasi labori puhtasse ossa, on kindlad protseduurid, millega välditakse võimaliku saastuse sattumist väliskeskkonnast laborisse (Orlando et al., 2021).

Järgmises etapis uuritav materjal proovistatakse, milleks on erinevaid võimalusi, nt puurimise, purustamise ja pulbristamise teel (Harney et al., 2020; Patzold et al., 2020; K. A. Sirak et al., 2017; Sugita et al., 2020). Enne ekstraheerimist materjal võimaluse korral dekontamineeritakse, kuid see sõltub materjalist (Boessenkool et al., 2017; Damgaard et al., 2015; Gamba et al., 2016; Korlević et al., 2015). Ekstraheerimiseks valitakse materjalile kohane, võimalikult vähest materjali kogust nõudev, aga samal ajal võimalikult efektiivne DNA eraldamiseks protokoll (Dabney et al., 2013; Höss ja Pääbo, 1993; Rohland ja Hofreiter, 2007; Rohland et al., 2018). Pärast ekstraheerimist saadud supernatant puhastatakse ning vajadusel töödeldakse uratsiilspetsiifilise väljalõikereagendiga (ingl k *Uracil-Specific Excision Reagent, USER*) – segu uratsiili DNA glükosülaasist (UDG) ja DNA glükosülaas-lüaas Endonukleas VIII-st (*New England Biolab*) –, eemaldamaks lämmastikaluseid uratsiile, mis on iseloomulikud vanale DNA-le ning tekkivad valdavalt DNA fragmentide otstesse seoses tsütosiini deaminatsiooniga (Briggs et al., 2007; Rohland et al., 2015).

Laborites, kus tegeletakse paleokeskkonna rekonstrueerimisega, kasutatakse metaribakoodi (ingl k *metabarcoding*) amplifikatsiooni meetodit polümeraasi ahelreaktsiooniga (PCR) (Hebert et al., 2003; Parducci et al., 2012). See meetod aitab taastada teavet koosluste liigilise mitmekesisuse kohta minevikus ning võimaldab üheaegselt identifitseerida paljusid eri liike. Tänu PCR-ile saab universaalsete praimerite abil amplifitseerida suurt hulka organismide samu sihtmärk-lookuseid (Hofreiter et al., 2003; Taberlet et al., 2007) (Alsos et al., 2016; Crump et al., 2019; Hebert et al., 2003; Parducci et al., 2012).

Viimaseks etapiks vana DNA laboris on genoomsete raamatukogude loomine, mille käigus lisatakse DNA fragmentidele lühikesed sünteetilised oligonukleotiidid ehk adapterid ja indeksid fragmentide sekveneerimisjärgseks bioinformaatiliseks identifitseerimiseks (Meyer ja Kircher, 2010). Alljärgnev joonis 3 näitab üldises plaanis erinevaid töövoos osi.



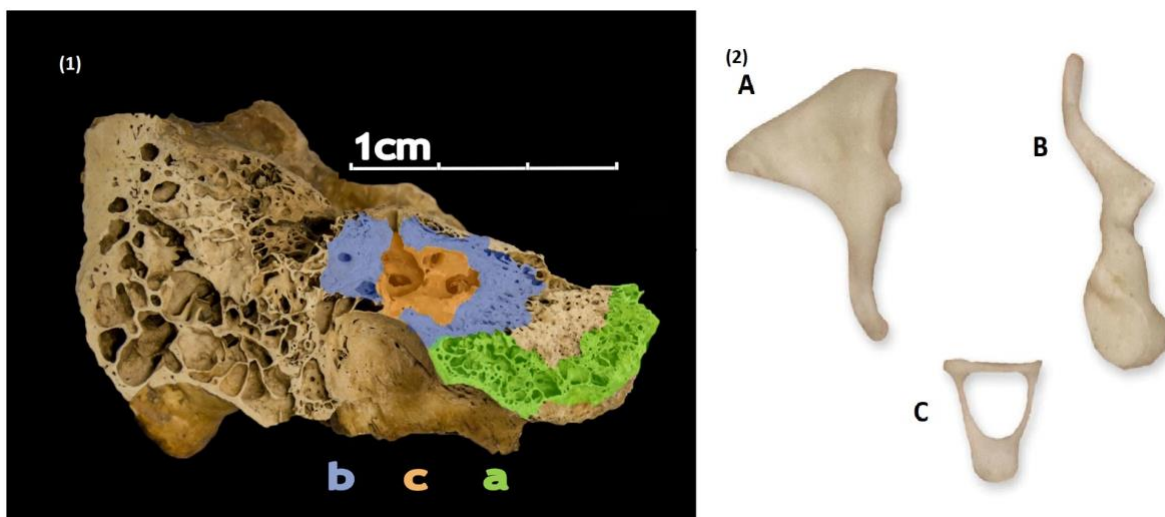
Joonis 3. Töövoog vana DNA materjalide käsitlemiseks ja analüüsiks (Orlando et al., 2021).

Järgnevad etapid nagu raamatukogude amplifitseerimine PCR-meetodil, viiakse läbi juba tavapärastes molekulaargeneetika laborites (Orlando et al., 2021). Amplifitseerimisele järgneb saadud produkti puhastamine, sekveneerimiseelne kvaliteedikontroll ja sekveneerimiseks ettevalmistamine (Meyer ja Kircher, 2010; Orlando et al., 2021). Seejärel kasutatakse sageli nn sihtmärgita (ingl k *shotgun*) sekveneerimist, mille puhul kaasatakse sekveneerimisse kõik edukalt raamatukogusse seotud fragmendid sõltumata nende päritolust (Adams, 2008; Chapman et al., 2015). Kuna vana DNA raamatukogudes on huvipakkuvate liikide DNA sisaldus sageli väga väike, siis on välja töötatud ka nn sihtmärgi rikastamise

meetodid (ingl k *target enrichment*), mille abil on võimalik huvipakkuva liigi DNA osakaalu suurendada (Byrne et al., 2022; Meyer ja Kircher, 2010; Rohland ja Reich, 2012; Vilgalys et al., 2023). Raamatukogus esinevate DNA fragmentide järjestuste kindlaks tegemiseks on enimkasutatud teise põlvkonna sekveneerimine (*Next-generation sequencing*, NGS) Illumina platvormil (Bentley et al., 2008), mis võimaldab samaaegselt lugeda väga suurt hulka järjestusi (Metzker, 2010). Pärast sekveneerimist teostatakse bioinformaatiline analüüs (Meyer ja Kircher, 2010; Orlando et al., 2021).

1.2.1. Vana DNA materjalid ja allikad.

Kui potentsiaalseid vana DNA allikaid uurima hakati, siis eeldati, et võimalikult hästi säilinud DNA-ga on kas looduslikult või kunstlikult mumifitseerunud ja konserveeritud, muuseumist pärinevad pehmed koed (nt nahk, lihased jne). Kahjuks säilivad pehmed koed, mis ei ole kas mumifitseerunud või konserveeritud, harva ning on sellisel juhul keskkonna mikroorganismidega väga saastunud (Higuchi et al., 1984; Pääbo et al., 1988). Parema tulemuse annavad karvanääpsud, kuna keratiinil on võime saasteaineid vähe läbi lasta ja proov on seetõttu hõlpsamini dekontamineeritav (Gilbert et al., 2006; Miller et al., 2008; Rasmussen et al., 2010).

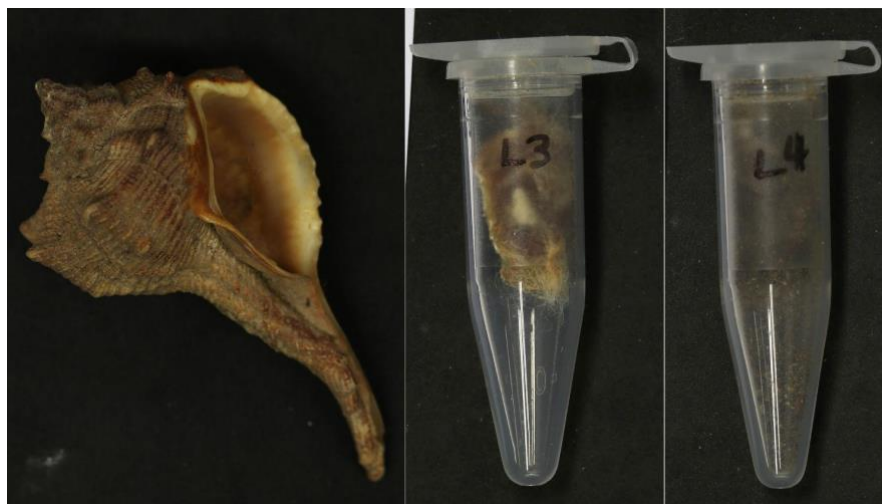


Joonis 4. Inimese kolju osad, milles vana DNA reeglina suhteliselt hästi säilib. (1) Kaljuluu. Erinevate värvidega on märgistatud erineva luulise tihedusega alad: roheline (a) – käsnjas osa; sinine (b) – sisekõrva ümbritsev tihe valge luu; oranž (c) – sisekõrva tihe luu (Pečnerová, 2016); **(2)** kuulmeluud: A - alasi (*incus*); B - vasar (*malleus*); C - jalus (*stapes*) (<https://www.skullsunlimited.com/products/real-human-inner-ear-ossicle-set>).

Eelpool mainitust veelgi paremini säilivad mineraliseerunud koed nagu selgroogsete luud ja hambad (Hagelberg et al., 1989), kuid ka neist on osa kõrgema endogeense ehk

organismiomase DNA sisaldusega kui teised (Parker et al., 2020). Näiteks inimese kaljuluud (Gamba et al., 2014; Pinhasi et al., 2015) (joonis 4 (1)), kuulmeluud (K. Sirak et al., 2020) (joonis 4 (2)) ja hambatsement (Damgaard et al., 2015) sisaldavad suures koguses inimese DNA-d, aga hamba dentiin samal ajal sisaldab lisaks endogeensele DNA-le ka iidsete veres esinevate patogeenide DNA-d (Bos et al., 2011; Margaryan et al., 2018).

Nüüdseks on vana DNA allikate valik laienenud paljudele teistele orgaanistele materjalidele, millest DNA eraldamine nõuab spetsiifilisemaid meetodeid. Näiteks hambakivi (Adler et al., 2013; Warinner et al., 2014), puit (Lendvay et al., 2018; Wagner et al., 2018), molluskite karbid (Der Sarkissian et al., 2017) ja koejäänused (Adema, 2021; Chakraborty et al., 2020) – näiteks *Bolinus brandaris* joonisel 5, setted (Armbrecht et al., 2019; Kjær et al., 2022; Pedersen et al., 2016; Slon et al., 2017) ning koproliidid (Byrne et al., 2022; Mosca Torres et al., 2022; Segesdi et al., 2017), aga ka “kultuurilised” esemed nagu pärgamendid (Teasdale et al., 2015) ja tekstiilid (O’Sullivan et al., 2016) ning kasetõrvast “nätsud” (Jensen et al., 2019; Kashuba et al., 2019). Lisaks on võimalik kasutada ka teatud kuivanud, vettinud, söestunud või mineraliseerunud materjale nagu õietolm (Suyama et al., 1996), tõlvikud (Jaenicke-Després et al., 2003; Ramos-Madrigal et al., 2016; Vallebuena-Estrada et al., 2016), seemned (Ramos-Madrigal et al., 2019), herbaariumiproovid (Weiß et al., 2016), aga ka suled (Rawlence et al., 2009), putukad (Goldstein ja Desalle, 2003) ja munakoored (Oskam et al., 2010).



Joonis 5. *Bolinus brandaris*. Teokarp; L3 operculum; L4 koejäänused. Materjal: Dr Maria Vittoria Modica; foto: Helja Niinemäe.

Igale neist materjalidest tuleb läheneda erineval moel, näiteks molluskite koejääkide puhul on DNA eraldamisel takistuseks kogu molluski keha kattev lima, mis sisaldab polüsahhariide ja polüfenoolseid valke (Adema, 2021; Chakraborty et al., 2020). Need ühendid moodustavad

DNA-ga komplekse ja inhibeerivad DNA-ga interakteeruvaid ensüüme, mis raskendab DNA eraldamist materjalist (Adema, 2021; Chakraborty et al., 2020). Koproliitide korral võib olla takistuseks materjali pH, kuna tegemist on iidsete väljaheidetega – kui materjali pH on madalam kui 5, siis suure tõenäosusega pole selles DNA-d säilinud, sest happelises keskkonnas DNA “selgroo” fosfodietersidemed katkevad (Massonneau et al., 2018; Orlando et al., 2021). Nahka on peamiselt uuritud muumiatel, mille puhul DNA säilivust ja eraldamist raskendavad tavaliselt kõrge temperatuur, haudade niiske keskkond ja palsameerimiseks kasutatud kemikaalid (Schuenemann et al., 2017).

1.2.2. Vana DNA raamatukogude protokollide arengud.

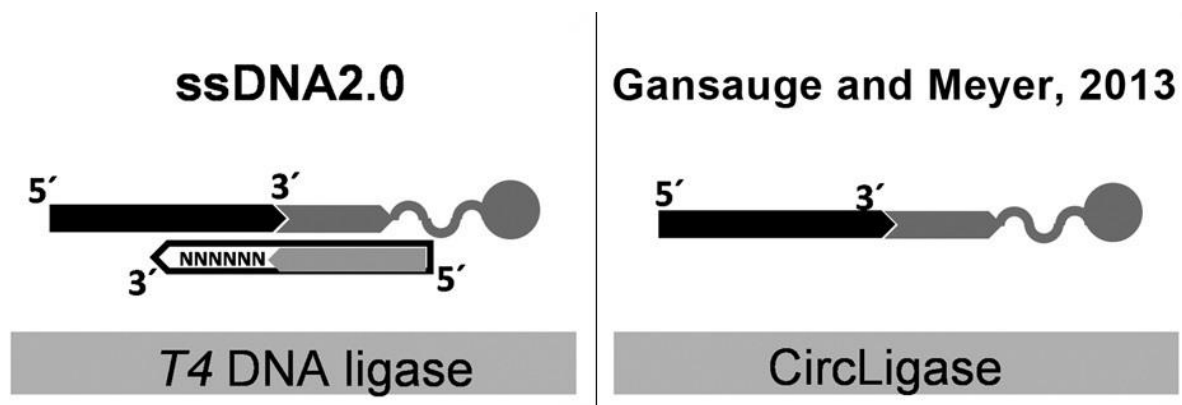
Esimene meetodika, mida kasutati vana DNA raamatukogude loomisel, oli PCR-i amplikonide molekulaarne kloonimine bakteriaalsetesse plasmiididesse (Noonan et al., 2005, 2006). Seejärel kasvatati bakterikolooniad, et saada piisavalt materjali sekveneerimiseks (Noonan et al., 2005, 2006).

Kuna NGS DNA raamatukogude valmistamine on oluliselt väiksema töömahuga, siis on praegu kasutusel kaks põhilist vana DNA raamatukogude loomise meetodit (Orlando et al., 2021) kaheaahelaliste (Carøe et al., 2018; Meyer ja Kircher, 2010) ning üheaahelaliste (Gansauge et al., 2017; Gansauge ja Meyer, 2013) DNA raamatukogude valmistamiseks. Mõlemal juhul on kasutusel erinevate modifikatsioonidega protokollid, mis erinevad üksteisest sisendiks vajamineva DNA koguse, laboritööle kuluva aja ja kulude osas (Carøe et al., 2018; Kapp et al., 2021).

Kaheaahelalise DNA raamatukogu protokollil puhul parandatakse vana DNA fragmentide otsad ja ligeeritakse kaheaahelaliste adapteritega (Briggs et al., 2007; Kircher et al., 2012; Meyer ja Kircher, 2010). Üheaahelalise DNA raamatukogu protokollil puhul ligeeritakse aga denatureeritud vana DNA matriitsid ja adapterid üheaahelaliste molekulidena (Gansauge et al., 2020; Gansauge ja Meyer, 2013; Meyer et al., 2012), mis annab suurema tundlikkuse väikese DNA sisaldusega proovide puhul, sest ka üleulatuvad 3'-OH otsad ja katketega ahelad kaasatakse muutmata kujul raamatukogusse (Orlando et al., 2021). Kaheaahelalise DNA raamatukogu loomisel need kas eemaldatakse ensümaatilisel või siis “rikutakse” protsessi käigus (Orlando et al., 2021).

Kuna üheaahelalise raamatukogu loomisel lisatakse adapterid ükshaaval – pärast DNA fragmentide defosforüülimist ja denatureerimist ligeeritakse esimene adapter ning adapteriga fragmendid fikseeritakse streptavidiiniga kaetud magnetkerakestele ja kõik järgnevad

reaktsioonietapid viiakse läbi kerakestel –, siis aitab see vältida materjali kaotsi minekut raamatukogude puhastamise ajal ja sekveneerimist segavate konstruktide teket (näiteks dimeerid) (Gansauge ja Meyer, 2014; Kapp et al., 2021). Algselt oli tegemist kulude poolest kallima protokolliga, aga nüüdseks on antud protokoll muudetud ja kasutusele on võetud odavamad kaheahelalise DNA ligaasid, tänu sellele, et kasutatakse nn lahasega adaptereid, mille ühel ahelal on otsas juhuslik järjestus, mis toestab ja võimaldab kaheahelalise DNA ligaasil teise adapteri ahela otsa DNA fragmendi ligeerida, nagu on näha joonisel 6 (Gansauge et al., 2017; Harkins et al., 2020).



Joonis 6. Üheaahelalise DNA ligeerimine T4 DNA ligaasiga ja *CircLigase*'iga (termostabiilne ligaas, mis katalüüsib üheaahelalise DNA ja RNA matriitsi molekulidesisest ligeerimist)(Gansauge et al., 2017).

Samuti on osade meetodite puhul võetud kasutusele nn ühe tuubi protseduurid, kus kõik raamatukogu protokollid viiakse läbi samas tuubis – iga järgnev reaktsioonisegu lisatakse eelmisele, mis omakorda vähendab materjalikadu puhastusel ja laboritöö aega (Carøe et al., 2018; Gansauge et al., 2020).

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö eesmärgid

Antud töö eesmärgiks oli testida DNA eraldamise protokolle erinevatest bioarheoloogilistest materjalidest eraldatud proovidel, võrrelda genoomsete raamatukogude valmistamise meetodikate sobivust nendest materjalidest eraldatud DNA sekveneerimiseks ning nende mõju vana DNA sekveneerimistulemustele. Selleks läbiti järgnevad etapid:

1. Proovistati erinevad bioarheoloogilised materjalid vastavalt materjali päritolule ja sobivale protokollile.
2. Eraldati vastava materjali spetsiifikat arvestades DNA, kasutades sobivat ekstraheerimisprotokolli.
3. Võrreldi
 - o naha proovide puhul erinevate lüüsimisaegade;
 - o koproliidi proovide puhul erinevate proovi kogustemõju DNA ekstrakti kontsentratsioonile.
4. Loodi erinevate bioarheoloogiliste materjalide kaupa ühe või kahe erineva protokolliga järgi paralleelselt genoomsed raamatukogud ja sekveneeriti vana DNA.
5. Mõlema raamatukogu protokollide tulemusi võrreldi omavahel, et selgitada välja, kas esineb erinevusi sekveneerimisandmete kvaliteedis:
 - o kas saadud andmed sisaldavad endogeenset (inimese) DNA-d;
 - o kui palju esineb PCR-i duplikaate;
 - o kui pikad on sekveneeritud DNA fragmendid.

2.2. Materjal ja metoodika

2.2.1 Arheoloogiline materjal vana DNA analüüsiks

Uurimistöös kasutati Tartu Ülikooli (TÜ) ajaloo ja arheoloogia instituudi kogudest pärinevaid inimese hambaid, hambakivi, naha- ja koproliidiproove ning TÜ ökoloogia- ja maateaduste instituudi kogude pinnaseproove. Proovid pärinevad erinevatelt arheoloogilistelt väljakaevamistelt ja geoloogilistest uuringutest. Meie koostööpartneriteks proovide valimisel olid arheoloogia professor Heiki Valk, laboratoorse arheoloogia professor Aivar Kriiska ja arheoloogia kaasprofessor Mari Tõrv ajaloo ja arheoloogia instituudist ning rakendusgeoloogia professor Alar Rosentau ja pinnakattegeoloogia kaasprofessor Tiit Hang ökoloogia- ja maateaduste instituudist. Kokku analüüsiti 44 proovi, mille hulka kuulusid 12 naha proovi kahest erinevast fragmendist ning 6 koproliidi proovi, mille allikaks oli 56 g koproliidi tükk.

2.2.1.1 Hambad

Töös kasutatud hambad pärinevad Eesti aladel elanud keskaegsetelt indiviididelt. DNA eraldamiseks kasutati kolmest erinevast leiukohast leitud 7 hammast (tabel 1).

Tabel 1. Uuringus kasutatud keskaegsed hambad ning nende leiukohad.

Jrk nr	Proovi ID	Leiukoht	
		Maakond	Kalmistu/Leiukoht
1.	TAA002A	Viljandimaa	Täaksi kalmistu
2.	TAA003A	Viljandimaa	Täaksi kalmistu
3.	TAA004A	Viljandimaa	Täaksi kalmistu
4.	TAA005A	Viljandimaa	Täaksi kalmistu
5.	KOY001A	Valgamaa	Koikküla kalmistu
6.	KOY002A	Valgamaa	Koikküla kalmistu
7.	MHG001A	Tartumaa	Miina Härma Gümnaasiumi hoov

2.2.1.2 Hambakivi

Hambakivi proovistati Eesti alal elanud keskaegsete indiviidide hammastelt. Kokku analüüsiti 7 indiviidi neljast erinevast leiukohtast (tabel 2).

Tabel 2. Uuringus kasutatud keskaegsed hambakivi proovid ning nende leiukohad.

Jrk nr	Proovi ID	Leiukoht	
		Maakond	Kalmistu/Leiukoht
1.	LOH001A	Tartumaa	Lohkva
2.	MAK002B	Valgamaa	Makita külakalmistu
3.	MAL008	Tartumaa	Mäletjärve külakalmistu
4.	TAT007	Tartumaa	Tartu Toomkirik
5.	TPM005	Tartumaa	Tartu Püha Maarja kalmistu
6.	TPM006	Tartumaa	Tartu Püha Maarja kalmistu
7.	TPM007	Tartumaa	Tartu Püha Maarja kalmistu

2.2.1.3 Nahk

Keskajast pärinev nahk proovistati samalt indiviidilt saadud kahest erinevast fragmendist, mõlemast fragmendist võeti kaks proovi, mis omakorda jagati kolmeks paralleelprooviks (tabel 3). Samalt indiviidilt proovistati ka hammas (tabel 1).

Tabel 3. Uuringus kasutatud keskaegsed inimese nahaproovid ning nende leiukohad.

Jrk nr	Proovi ID	Leiukoht	
		Maakond	Leiukoht
1.	MHG001C	Tartumaa	Miina Härma Gümnaasiumi hoov
2.	MHG001D	Tartumaa	Miina Härma Gümnaasiumi hoov

2.2.1.4 Koproliid

Uuringus kasutatud koproliidid proov pärineb Tartust, Ülejõelt, kunagise Hugo Treffneri gümnaasiumi hoovilt leitud keskaegsest jäätmekastist. Proovi kogukaal oli 56 g, proovistati mõlemalt koproliiditüki küljelt kolm paralleelproovi (tabel 4).

Tabel 4. Uuringus kasutatud keskaegsed koproliidiproovid ning nende leiukohad.

Jrk nr	Proovi ID	Leiukoht	
		Maakond	Leiukoht
1.	HTG001A	Tartumaa	Hugo Treffneri Gümnaasiumi hoov
2.	HTG001B	Tartumaa	Hugo Treffneri Gümnaasiumi hoov
3.	HTG001C	Tartumaa	Hugo Treffneri Gümnaasiumi hoov
4.	HTG001D	Tartumaa	Hugo Treffneri Gümnaasiumi hoov
5.	HTG001E	Tartumaa	Hugo Treffneri Gümnaasiumi hoov
6.	HTG001F	Tartumaa	Hugo Treffneri Gümnaasiumi hoov

2.2.1.5 Pinnas

Uuringus kasutatud pinnaseproovid pärinevad kahest mesoliitilisest asulakohast – Reiu ja Sindi-Lodja. Mõlema puurimiskoha puursüdamikest võetud proovidest valiti 6 proovi, mis vastasid kunagise maismaa- ja merepiiri üleminekutsoonile (Reiu) või mesoliitilisele asulakohale (Sindi-Lodja II). Valiku tegemisel järgiti geoloogidelt saadud juhiseid (tabel 5).

Tabel 5. Uuringus kasutatud pinnaseproovid, mesoliitiline asulakoht, proovi sügavus maapinnast

Jrk nr	Proovi ID	Puurimiskoht		Sügavus (cm)
		Maakond	Asulakoht	
1.	REI002	Pärnumaa	Reiu	266.5
2.	REI004	Pärnumaa	Reiu	277
3.	REI006	Pärnumaa	Reiu	285
4.	REI009	Pärnumaa	Reiu	290.5
5.	REI014	Pärnumaa	Reiu	339
6.	REI017	Pärnumaa	Reiu	374.5
7.	SLI002	Pärnumaa	Sindi-Lodja II	254
8.	SLI003	Pärnumaa	Sindi-Lodja II	258
9.	SLI004	Pärnumaa	Sindi-Lodja II	268
10.	SLI006	Pärnumaa	Sindi-Lodja II	273
11.	SLI007	Pärnumaa	Sindi-Lodja II	275
12.	SLI008	Pärnumaa	Sindi-Lodja II	277

2.2.2 Materjali andmete kataloogimine

Enne proovistamist tehti kõikidest proovidest fotod. Hambad ja hambakivi koos hambaga pildistati kolmest küljest (joonis 7 ja joonis 8). Nahk pildistati koos ümbritseva kotiga mõlemast küljest (joonis 9). Koproliidilt eemaldati kott ja pildistati kahest küljest, lisaks pildistati proovistamise ajal proovivõtu punktid (joonis 10). Pinnaseproovid pildistati koos ümbritseva tuubiga nii sildiga kui sildita küljest (joonis 11). Kõik fotod ja proovidega kaasas olev info sisestati ja salvestati TÜ genoomika instituudi (GI) Eesti Biokeskuse vana DNA labori andmebaasi. Vajadusel on neid võimalik neid kasutada edasisteks uuringuteks.

2.2.3 Materjali proovistamine

DNA eraldamine toimus aastatel 2022–2023 TÜ GI Eesti Biokeskuse vana DNA laboris. Iga materjali jaoks kasutati konkreetse materjali jaoks sobivat meetodit. Materjali proovistamiseks tuli kõik proovikotid laborisse sisseviimisel puhastada, samuti tuli laborisse sisenemiseks vahetada riided laboririiete vastu, mille peale omakorda pandi spetsiaalne

kaitseriietus (esimene paar nitrilkindaid, näomask, juuksevõrk, kaitseülikond, kummikud ja teine paar nitrilkindaid). Tööpinnad, töövahendid, väljast laborisse tulevad proovikotid puhastati DNA-ExitusPlusi lahusega (PanReacAppliChem). Proovide jaoks sildistati uued kotikesed ja proov tõsteti uude kotikesse, vältides proovi katsumist sõrmedega. Nende meetmetega välditakse saastuse jõudmist puhaslaborisse.

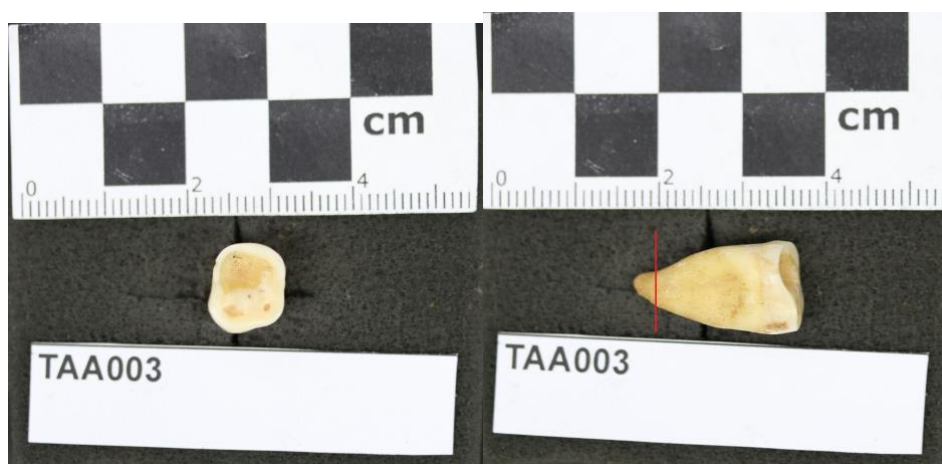
2.2.3.1 Ruumi ja tööpinna ettevalmistamine proovistamiseks

Proovistamiseks kasutati selleks ettenähtud proovistamisruumi vana DNA laboris. Kogu töö toimus laminaarkapis (Mars B2 1200, Scanlaf, LaboGene), vältimaks proovistamisel tekkiva tolmu jõudmist ümbritsevasse ruumi. Töötasapinnad, puur, puurivõti ja tangid puhastati DNA-ExitusPlus lahusega. Kaks komplekti pintsette, hambasonde ja lõikekettaid asetati enne kasutamist ~6% naatriumhüpokloriti (NaOCl) lahusesse kuni 10 minutiks, seejärel loputati neid Milli Q (Merc Millipore system) vees ja 70% etanooli lahuses ning asetati puhtale paberrätikule kuivama (enne kasutamist kuivatati instrumente paberrätikuga). Nii toimiti ka pärast iga proovistamist. Laminaarkapi põhi kaeti kahe alumiiniumfooliumi tükiga, mis kattis kogu põhja äärest ääreni. Ülejäävad servad keerati tagasi ja volditi alla. Järgmiseks volditi fooliumist “sein”, millel oli kaks pikemat külge ja üks lühike külge (sellest küljest tuli sisse puur). “Seina” sisse asetati puhas fooliumileht, mida vahetati iga proovi võtmise järel. Fooliumilehele asetati lõikeketas, pintsetid, kaalukauss (vajadusel koos kaalupaberiga), fooliumiribad ja DNA-ExitusPlusi lahusega puhastatud hambatangid. Proovikotike koos prooviga ja eelnevalt märgistatud pisem minigrip kotike või 1,5 ml Eppendorf LoBind tuub (eelnevalt tühjalt kaalutud) proovistatud proovi jaoks asetati “seinast” väljapoole, selle kõrvale. Enne lõikamise alustamist eemaldati pealmine kindapaar, tõmmati kaitseülikonna varrukate peale kilevarrukad ja siis pandi uued kindad. Pärast proovistamist volditi fooliumileht tihedalt kokku, et vältida sellel oleva hambapulbri sattumist ümbritsevale tööpinnale ning eemaldati koos kaalukaussiga ja tangide ümber olnud fooliumiribadega ning visati prügikasti. Instrumendid loputati Milli Q veega ja asetati ~6% naatriumhüpokloriti lahusesse. Pealmine kindapaar koos kilevarrukatega eemaldati ja visati prügikasti. Võeti uus kindapaar. Kogu protsessi korrati iga proovi korral.

2.2.3.2 Materjali proovistamine

2.2.3.2.1 Hambad

Hamba puhul kasutati prooviks umbes 5 mm pikkust juuretipus olevat osa (joonis 7). Fooliumiribad mässiti hambatangide haaramisala ümber, vältimaks puurimisel tekkiva tolmu sattumist haaramisala soonelisele pinnale. Hammas võeti pintsettidega kotist välja ja asetati tangide vahele. Eelnevalt puurile kinnitatud lõikekettaga lõigati kaalukausi kohal juuretipp. Lõigatud juuretipp asetati valmis pandud märgistatud minigrip kotikesse ja alles jäänud hammas tagasi proovikotti (Keller ja Scheib, 2023c).



Joonis 7. Indiviidi TAA003 hamba pildid pealt- ja külgvaates. Lõikekoht on märgistatud punase joonega.

2.2.3.2.2 Hambakivi

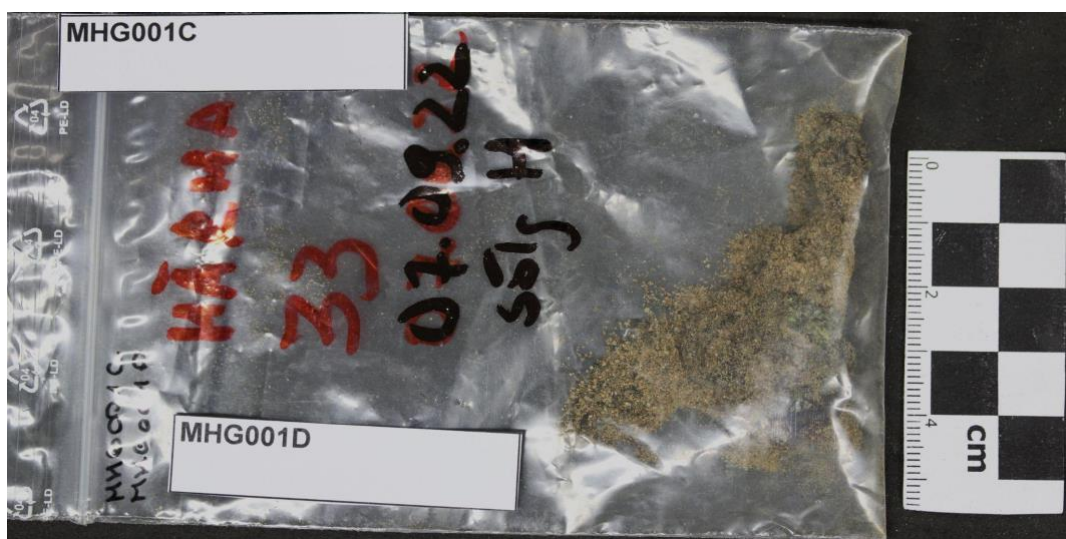
Hambakivi (joonis 8) eemaldamiseks kasutati hambasondi. Selleks asetati hammas puhtasse minigripkottikesse (vältimaks eemaldatud hambakivi sattumist proovistamisalalt välja) hambakroon kotiava suunas, hammast hoiti läbi koti hambajuurest ja hambasondi kasutades lükati ettevaatlikult hambakivi hamba küljest lahti. Kui kogu hambakivi oli eemaldatud, võeti hammas ettevaatlikult kotist välja ja asetati tagasi proovikotti. Hambakivi valati mingripkotikesest kaalukaussi ja sealt valmis pandud 1,5 ml Eppendorf LoBind tuubi. Tuub kaaluti koos prooviga ja saadud kaalumistulemustest arvutati saadud proovi kogus.



Joonis 8. Indiviidi MAL008 alumine lõualuu koos selles asetseva purihambaga. Hambakivi on märgistatud punase ovaalse joonega.

2.2.3.2.3 Nahk

Naha fragment (joonis 9) puhastati hambaharjaga lahtisest pinnasest. Eemaldatud pinnas koguti eelnevalt sildistatud ja kaalutud 5 ml Eppendorf LoBind tuubi. Seejärel kasutati pintsette, eemaldamaks fragmendi äärtest naha tükikesi analüüsi jaoks. Rebitud tükid asetati valmis pandud 1,5 ml Eppendorf LoBind tuubi. Tuub kaaluti ja saadud kaalumistulemustest arvutati proovi kaal.



Joonis 9. Naha fragment. Pildistatud läbi koti, kuna sisaldab lahtist pinnast.

2.2.3.2.4 Koproliit

Koproliidi (joonis 10) proovistamiseks võeti kaks kaalukaussi. Esimest kaalukaussi kasutati puurimise ajal. Graveerimisotsikuga puhastati sobiv ala pealmisest kihist ja raputati

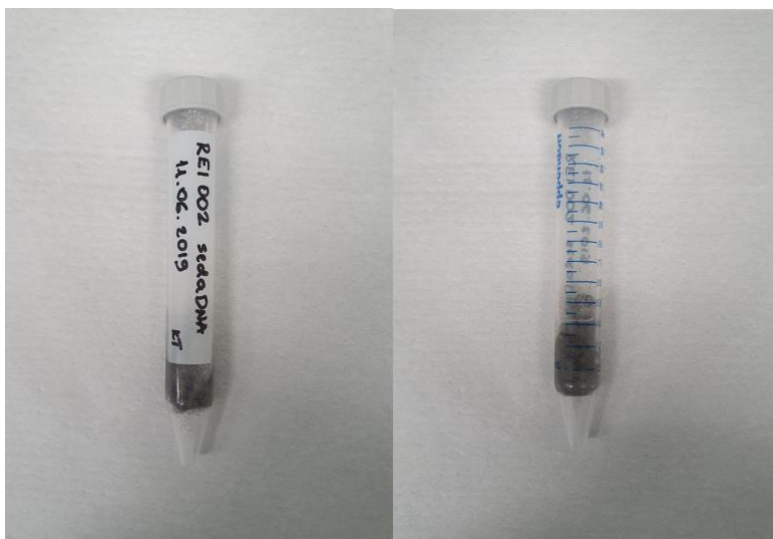
eemaldatud materjal kaussi, seejärel puuriti väljaheite tükki sisse ja saadud materjal raputati teise kaalukaussi, mille sees on kaalupaber. Kaalupaberi abil viidi saadud proov eelnevalt märgistatud ja kaalutud PowerBead Pro tuubi. Katses kasutati kahte kaalutist: ≤ 250 mg ja ≤ 125 mg.



Joonis 10. Koproliid. Punaste ovaalidega on märgistatud proovistamiskohad.

2.2.3.2.5 Pinnas

Pinnaseproov (joonis 11) võeti puursüdamikust süstlaga, mille nõelapoolne osa oli maha lõigatud. Proovivõtmiseks suruti süstal sobivast kohast puursüdamikku risti puurimise suunaga. Esmase proovivõtu viisid läbi Alar Rosentau, Tiit Hang, Aivar Kriiska ja Kristiina Tambets. Süstlas proovid toimetati laborisse, kus viidi läbi esmane proovistamine, mille käigus eemaldati silindrikujulise pinnaseproovi eesmisest ja tagumisest otsast paari sentimeetri paksused seibid ja keskmine osa asetati steriilsesse 15 ml tuubi. Pinnasesilinder valati edasiseks proovistamiseks tuubist kaalukaussi. Proovisilindrilt lõigati spaatlit kasutades esimesest otsast umbes sentimeetri paksune kiht ja proovistati selle kihi sisemine osa. Ülejäänud proov ja proovistatud koha välimised tükid asetati tagasi tuubi. Võetud proov asetati eelnevalt märgistatud ja kaalutud PowerBead Pro tuubi. Katses kasutati kaalutisi ≤ 250 mg ja ≤ 125 mg. Ülejäänud materjal säilitati -20 kraadi juures.



Joonis 11. Pinnaseproov. Proov on silinderjas, võetud kindlalt sügavuselt puursüdamikust 10 ml süstla abil.

2.2.4 DNA ekstraheerimine, ekstraktide puhastamine ja ettevalmistamine raamatukogude loomiseks

Iga materjali tuli enne raamatukogude loomist erinevalt käsitseda. Hambajuurte ja hambakivi puhul oli vaja enne DNA ekstraheerimist materjal keemiliselt puhastada. Naha ja väljaheite puhul eelnes DNA ekstraheerimisele füüsiline puhastamine, mis viidi läbi juba proovistamise käigus.

2.2.4.1 Hambad

Hammastest DNA ekstraheerimine ja DNA ekstrakti puhastamine tehti TÜ GI vana DNA labori standardprotokolli järgi (Keller ja Scheib, 2023a, 2023d). Kõigepealt valmistati proovide jaoks ette paberiga kaetud tuubihoidiku kaas, millele on joonistatud ruudustik ja iga ruut on tähistatud proovi nimega. See asetati laminaarkapi põhjale asetatud fooliumilehele. Laminaarkapi klaas suleti ja lülitati sisse UV-lamp. Enne ekstraheerimist puhastati hambajuure tükid pindmisest saastusest. Selleks võeti iga proovi kohta kaks 50 ml tuubi. Esimesse valati umbes 5 ml ~6% naatriumhüpokloritit ja teise umbes 5 ml 70% etanooli lahust. Märgistati keskmise suurusega kaalukauss, hambajuuretükk asetati kaalukaussi. Eelnevalt ~6% naatriumhüpokloriti sisse asetatud pintsettide ja hambaharjaga ettevaatlikult harjates eemaldati lahtine mustus. Järgmiseks pandi hambajuuretükk naatriumhüpokloritit sisaldavasse tuubi ja loksutati tuubi 5 minutit. Seejärel kallati naatriumhüpoklorit tuubist ettevaatlikult välja, vältides proovi väljakukkumist. Proovi loputati kolm korda Milli Q veega. Pärast seda viidi proov üle etanooliga tuubi ja loksutati 2 minutit. Etanool valati tuubist ettevaatlikult välja. Proovid koos tuubidega tõsteti laminaarkappi, võeti puhas paberrätik ning

proov kummutati tuubist paberrätikule, et eemaldada liigne etanool. Laminaarkapi klaas suleti ja UV-lamp lülitati uuesti sisse. Proovid jäeti kuivama kaheks tunniks (Keller ja Scheib, 2023b). Pärast seda tõsteti proovid koos alusega laminaarkapist välja. Laminaarkappi asetati vajaminevad tarvikud (va proteinaas K), mis eelnevalt puhastati DNA-ExitusPlusi lahusega. Proovid kaaluti ja saadud kaalutiste järgi arvutati välja vajaminevad ekstraheerimispuhvri komponentide EDTA (etüleendiamiintetraäädikhape, 0,5 M, pH 8) ja proteinaas K (Roche, 18,2 mg/ml) kogused. Kui proovi kaal jäi alla 50 mg, siis ekstraheerimispuhvrit lisati sama kogus, kui 50 mg proovile. Pärast kaalumist ja arvutamist märgistati 5 ml Eppendorf LoBind tuubid. Kõigepealt pipeteeriti EDTA 0,5M lahus tuubidesse, siis proteinaas K lahus. Seejärel lisati igasse vastavalt märgistatud tuubi proovitükk. Tuubide kaaned mässiti parafilmi, et vältida vedeliku lekkimist ja asetati loksutile (*Nutating mixer* (VWR)) kolmeks ööpäevaks (Keller ja Scheib, 2023a). Seejärel proovid tsentrifuugiti (Eppendorf Centrifuge 5810R, rootor A-4-81) kiirusega 4000 pööret minutis (rpm, ingl k *revolutions per minute*) 5 minutit. Saadud supernatant viidi Sartorius Vivaspin 15 30kDa tuubidesse ja tsentrifuugiti 25-45 minutit sõltuvalt supernatandi kogusest mahuni ~250 µl. Pärast supernatandi kontsentreerimist pipeteeriti see *Roche High Pure Viral Nucleic Acid Large Volume Kit* kolonnidesse, kuhu eelnevalt lisati 2,5 ml Qiagen PB puhvrit (*MinElute PCR Purification Kit*), millega seoti supernatandis olev DNA filtrile. Järgmiseks pesti filtril olevat DNA-d Qiagen PE puhvriga (*MinElute PCR Purification Kit*), lisades igasse kolonni 1 ml lahust. Kolonnilt eemaldati lehter ja 50 ml kogumistuub, kolonn asetati 2 ml kogumistuubi ja tsentrifuugiti (Eppendorf Centrifuge 5810R, rootor FA-45–30-11) filtri kuivatamiseks 1 minut kiirusega 13000 rpm. Nüüd asetati kolonn tühja eelnevalt märgistatud 1,5 ml Eppendorf LoBind tuubi ja lisati DNA elueerimiseks filtrile 100 µl Qiagen EB puhvrit (*MinElute PCR Purification Kit*), mille järel inkubeeriti tuube 37 °C juures 10 minutit ning tsentrifuugiti kiirusel 13000 rpm 2 minutit.

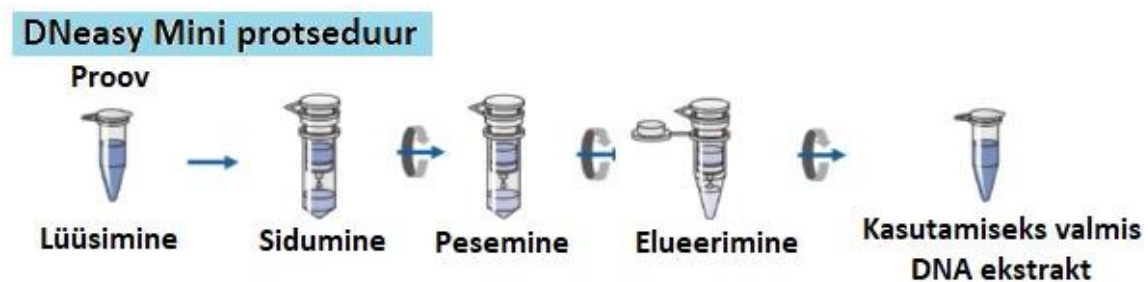
2.2.4.2 Hambakivi

Laminaarkapi ettevalmistamiseks asetati kapi põhja alumiiniumfooliumi tükk, millele asetati eelnevalt puhastatud vajaminevad tarvikud ja reagentid. Proovistamise käigus juba kaalutud proovidele, mis olid 1,5 ml Eppendorf LoBind tuubides, lisati 500 µl 0,5M EDTA lahust (pH 8,0). Tuube segati vorteksil ja inkubeeriti toatemperatuuril 5 minutit. Sade tsentrifuugiti lauatsentrifuugiga põhja ning supernatant viidi pipetiga, ettevalmistatud tühja tuubi (märgistatud: kaanel - projekti kood, proovi ID, *1st wash*; küljel - *1st wash*, proovi ID, projekti kood, teostaja initsiaalid, kuupäev). Proovi tuubi lisati uuesti 500 µl 0,5M EDTA lahust (pH 8,0).

Tuubi segati vorteksil ja tuubi kaane osa mähiti parafilmiga ning tuub asetati loksutile ja inkubeeriti toatemperatuuril nädal aega. Pärast lüüsimist võeti proovid loksutilt ja tsentrifuugiti (Eppendorf Centrifuge 5810R, rootor FA-45–30-11) kiirusega 13000 rpm 2 minutit. Saadud supernatandist viidi 450 µl *Roche High Pure Viral Nucleic Acid Large Volume Kit* kolonnidesse, kuhu eelnevalt lisati 4,5 ml Qiagen PB puhvrit (*MinElute PCR Purification Kit*). Edasi jätkati samuti kui hammaste puhul.

2.2.4.3 Nahk

Nahaproovidest DNA ekstraheerimiseks kasutati Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kit-i. Meile sobiva protokoll koostamiseks kasutati Qiageni poolt tootega kaasa tulevat käsiraamatut (joonis 12) (Qiagen). Kuna nahaproovide võimalik lüüsimisaeg antud kitiga ei olnud selgelt määratletud, testiti kolme erinevat lüüsimisaega – 24, 48 ja 72 tundi.



Joonis 12. DNeasy Mini protseduur.

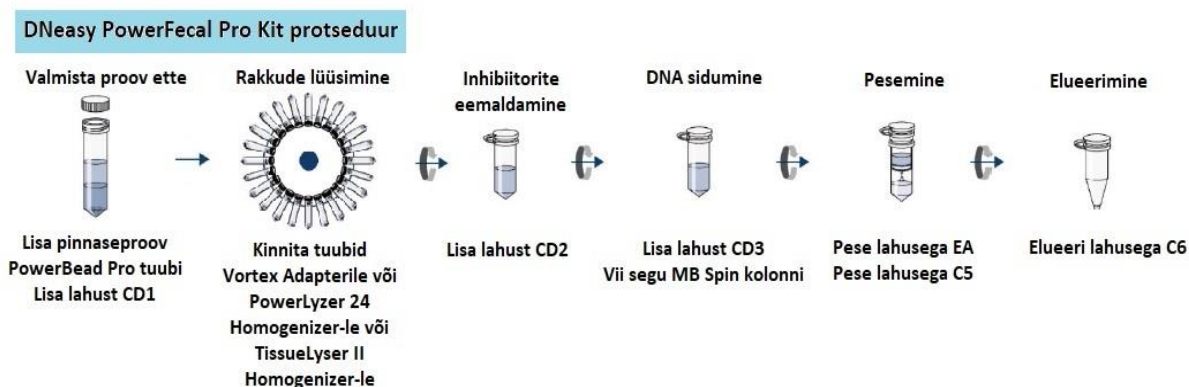
(<https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/dna-purification/genomic-dna/dneasy-blood-and-tissue-kit>)

Proovistamise käigus juba kaalutud ja 1,5 ml Eppendorf LoBind tuubi asetatud proovile lisati 180 µl Qiagen ALT puhvrit ja 20 µl Qiagen proteinaas K-d (lüüsipuhvrisegu). Tuubi segati vorteksiga ja tuubi kaaneosa mähiti parafilmiga. Proovid asetati eelnevalt soojendatud inkubaatorisse loksutile 56 °C juurde, igaks lüüsimisajaks kummastki nahafragmendist kaks paralleelproovi. Iga lüüsimisaja kohta lisati ka negatiivne kontroll. Pärast lüüsimisaja lõppu võeti proovid loksutilt, valmistati ette laminaarkapp, kuhu asetati eelnevalt puhastatud tarvikud ja reagentid, ning pipeteeriti valmis töölahused. Proovituubidelt eemaldati parafilm ja neid segati vorteksil 15 sekundit. Seejärel tsentrifuugiti tuube lauatsentrifuugil, lisati 200 µl Qiagen puhvrit AL, segati vorteksil 30 sekundit ning inkubeeriti proove 56 °C juures 10 minutit. Pärast inkubeerimist tsentrifuugiti (Eppendorf Centrifuge 5810R, rootor FA-45–30-11) proove kiirusel 7509 rpm (6000 x g) 1 minut ja lisati segule 200 µl etanooli (99%) ning segati vorteksiga põhjalikult ning seejärel tsentrifuugiti tuube kiirusel 7509 rpm (6000 x g) 1 minut. Seejärel viidi

saadud segu üle DNeasy Mini spin-koloni, mis oli asetatud 2 ml kogumistuubi (eeldatav kogus umbes 600 µl). Tuube tsentrifuugiti kiirusel 7509 rpm (6000 x g) 1 minut, läbivoolanud vedelik visati ära. Kolonn asetati uude 2 ml kogumistuubi ja lisati 500 µl Qiagen puhvrit AW1. Tuube tsentrifuugiti kiirusel 7509 rpm (6000 x g) 1 minut, läbivoolanud vedelik visati ära ning kolonn asetati uude 2 ml kogumistuubi ja lisati 500 µl Qiagen puhvrit AW2. Tuube tsentrifuugiti kiirusel 13710 rpm (20000 x g) 3 minut, läbivoolanud vedelik visati ära. Kolonn viidi eelnevalt märgistatud 1,5 ml Eppendorf LoBind tuubi. Proovi elueerimiseks lisati kolonni filtri keskele 50 µl Qiagen puhvrit AE, inkubeeriti toatemperatuuril 1 minut ja tsentrifuugiti kiirusel 7509 rpm (6000 x g) 1 minut. Elueerimist korrati, nii et ekstrakti lõplikuks koguseks oli 100 µl.

2.2.4.4 Koproliit

Koproliidist DNA ekstraheerimiseks kasutati Qiagen QIAamp PowerFecal Pro DNA Kit-i. Meile sobiva protokoll koostamiseks kasutati Qiageni poolt tootega kaasa tulevat käsiraamatut (joonis 13) (Qiagen). Esimene ekstraheerimine viidi läbi käsiraamatus toodud proovi kogusega (250 mg), kuid kuna materjal oli läbi kuivanud ja ei sisaldanud niiskust, oli proovistatud materjali maht väga suur. Seetõttu korrati ekstraheerimist kaks korda väiksema proovi kogusega.



Joonis 13. DNeasy PowerFecal Pro Kit protseduur.

(<https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/dna-purification/genomic-dna/qiaamp-powerfecal-pro-dna-kit>)

Ekstraheerimiseks kaaluti PowerBead Pro tuubid enne ja pärast proovi lisamist (vajalik sobiva kaalutise saamiseks) ning tuubid märgistati. Enne proovi lisamist tsentrifuugiti PowerBead Pro tuube lauatsentrifuugil, et tuubis olevad kerakesed asetuksid tuubi põhja. Pärast proovi lisamist segati proovimaterjal ja kerakesed vorteksil ning tsentrifuugiti alla. Saadud kerakeste ja proovimaterjali segule lisati 800 µl Qiagen CD1 lahust ning segati vorteksil 30 sekundit.

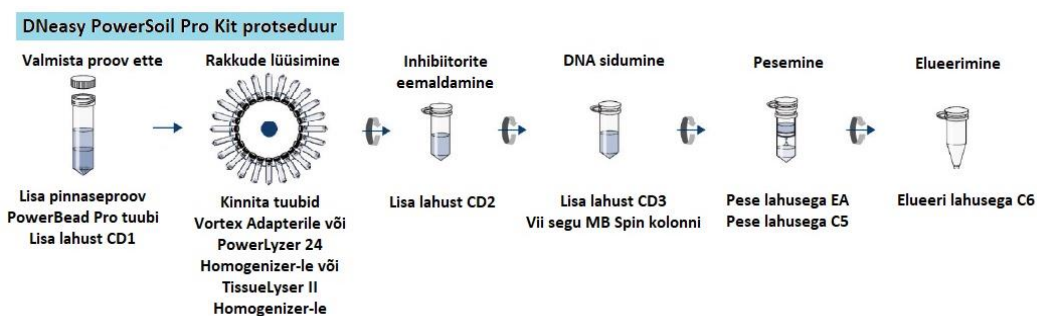
Esimeses katses kinitati tuubid koheselt pärast lahuse lisamist vertikaalselt FastPrep-24 Classic instrumendile ja homogeniseeriti kiirusel 4 m/s 30 sekundit. Proovidel lasti 30 sekundit seista ning seejärel korraldati tsükli 10 minuti jooksul. Tuube tsentrifuugiti (Eppendorf Centrifuge 5810R, rootor FA-45–30-11) kiirusel 11873 rpm (15000 x g) 1 minut. Seejärel viidi saadud supernatant (kogus ~200–300 µl, käsiraamatu järgi oodatav kogus 500-600 µl) puhtasse 2 ml mikrotsentrifuugi tuubi (on komplektis kaasas). Lisati 200 µl Qiagen CD2 lahust ja tuube segati vorteksil 5 sekundit ning seejärel tsentrifuugiti kiirusel 11873 rpm (15000 x g) 1 minut. Sadet puutumata pipeteeriti ~400 µl supernatanti (käsiraamatu järgi oodatav kogus 500-600 µl) uude 2 ml mikrotsentrifuugi tuubi, millele lisati umbes 600 µl Qiagen CD3 lahust ja segati vorteksil 5 sekundit. Järgmiseks pipeteeriti 650 µl lüsaati kolonnile MB (on komplektis kaasas), tsentrifuugiti kiirusel 11873 rpm (15000 x g) 1 minut ja läbivoolanud vedelik visati ära. Tegevust korraldati kuni kogu lüsaat oli läbinud kolonni MB. Seejärel asetati kolonn MB uude 2 ml kogumistuubi (on komplektis kaasas). Kolonnile MB pipeteeriti 500 µl Qiagen EA lahust ja tsentrifuugiti kiirusel 11873 rpm (15000 x g) 1 minut, läbivoolanud vedelik visati ära. Järgmiseks lisati kolonnile MB 500 µl Qiageni C5 lahust, tsentrifuugiti kiirusel 11873 rpm (15000 x g) 1 minut ja läbivoolanud vedelik visati ära. Kolonn MB asetati uude 2 ml kogumistuubi ja tsentrifuugiti kolonni kuivatamiseks kiirusel 12263 rpm (16000 x g) 2 minutit. Pärast kuivatamist asetati kolonn MB puhtasse märgistatud 1,5 ml elueerimistuubi (on komplektis kaasas). DNA elueerimiseks pipeteeriti Qiagen C6 lahust filtrimembraani keskele, inkubeeriti 1 minut toatemperatuuril ja tsentrifuugiti kiirusel 11873 rpm (15000 x g) 1 minut. Elueerimist korraldati, nii et ekstrakti lõplik kogus on 100 µl. Käsiraamatus tuuakse välja, et elueerimislahuse mitmekordne lisamine tõstab saadava DNA kogust.

Kordusekstraheerimise puhul proovistati koproliidi tükist kaks uut proovi (uuest kohast, mõlemalt küljelt üks) kaaluga ~125 mg ja võeti juba kõik neli esimeses katses proovistatud materjali PowerBead Pro tuubid koos prooviga (säilitatud sügavkülmas -25 °C juures) ning lisati igasse tuubi 800 µl Qiagen CD1 lahust. Seejärel inkubeeriti tuube 65 °C juures 10 minutit (käsiraamatus oli see osa näidatud soovitusel, aga hinnates materjali, otsustati see etapp kordusekstraheerimisel protokollis sisse viia). Kuna kasutatav homogenisaator erines käsiraamatus kirjeldatud seadmest ning käsiraamatus oli lisatud hoiatus lühikeste DNA fragmentide võimalikust hävitamisest, kui kasutada maksimum kiirust, siis otsustati muuta ka homogeniseerimisrežiimi, vähendades tsükli arvu. Pärast inkubeerimist kinnitati tuubid vertikaalselt FastPrep-24 Classic instrumendile ja homogeniseeriti kiirusel 4 m/s 30 sekundit, lasti proovidel 30 sekundit seista ja korraldati tegevust veel viis korda. Seejärel viidi saadud

supernatant (kogus ~500–600 µl) puhtasse 2 ml mikrotsentrifuugi tuubi. Edasi jätkati nii nagu esimesel ekstraheerimisel.

2.2.4.5 Pinnas

Pinnaseproovidest DNA ekstraheerimiseks kasutati Qiagen DNeasy PowerSoil Pro Kit-i. Meile sobiva protokolliga koostamiseks kasutati Qiageni poolt tootega kaasa tulevat käsiraamatut (joonis 14) (Qiagen).



Joonis 14. DNeasy PowerSoil Pro Kit protseduur.

(<https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/dna-purification/microbial-dna/dneasy-powersoil-pro-kit>)

Ekstraheerimiseks kaaluti PowerBead Pro tuubid enne ja pärast proovi lisamist (vajalik sobiva kaalutise saamiseks) ja tuubid märgistati. Enne proovi lisamist tsentrifuugiti PowerBead Pro tuube lauatsentrifuugil, et tuubis olevad kerakesed asetuksid tuubi põhja. Pärast proovistamist segati proovimaterjal ja kerakesed vorteksil ning tsentrifuugiti alla. Saadud kerakeste ja proovimaterjali segule lisati 800 µl Qiagen CD1 lahust ning segati vorteksil 30 sekundit. Seejärel inkubeeriti tuube 65 °C juures 10 minutit (käsiraamatus oli see osa näidatud soovitusel, aga hinnates materjali, otsustati see etapp protokollis sisse viia). Kuna kasutatav homogenisaator erines käsiraamatus kirjeldatud seadmest ning käsiraamatus oli lisatud hoiatus lühikeste DNA fragmentide võimalikust hävitamisest, kui kasutada maksimum kiirust, siis otsustati muuta ka homogeniseerimisrežiimi, vähendades tsükli arvu. Pärast inkubeerimist kinnitati tuubid vertikaalselt FastPrep-24 Classic instrumendile ja homogeniseeriti kiirusel 4 m/s 30 sekundit, lasti proovidel 30 sekundit seista ja korrati tegevust veel viis korda. Seejärel viidi saadud supernatant (kogus ~500–600 µl) puhtasse 2 ml mikrotsentrifuugi tuubi (on komplektis kaasas). Lisati 200 µl Qiagen CD2 lahust ja tuube segati vorteksil 5 sekundit ning seejärel tsentrifuugiti (Eppendorf Centrifuge 5810R, rootor FA-45–30-11) kiirusel 11873 rpm (15000 x g) 1 minut. Sadet puutumata pipeteeriti ~400 µl supernatanti (käsiraamatu järgi

oodatav kogus 500-600 µl) uude 2 ml mikrotsentrifuugi tuubi, millele lisati umbes 600 µl Qiagen CD3 lahust ja segati vorteksil 5 sekundit. Järgmiseks pipeteeriti 650 µl lüsaati kolonnile MB (on komplektis kaasas), tsentrifuugiti kiirusel 11873 rpm (15000 x g) 1 minut ja läbivoolanud vedelik visati ära. Tegevust korrati kuni kogu lüsaat oli läbinud kolonni MB. Seejärel asetati kolonn MB uude 2 ml kogumistuubi (on komplektis kaasas). Kolonnile MB pipeteeriti 500 µl Qiagen EA lahust ja tsentrifuugiti kiirusel 11873 rpm (15000 x g) 1 minut, läbivoolanud vedelik visati ära. Järgmiseks lisati kolonnile MB 500 µl Qiageni C5 lahust, tsentrifuugiti kiirusel 11873 rpm (15000 x g) 1 minut ja läbivoolanud vedelik visati ära. Kolonn MB asetati uude 2 ml kogumistuubi ja tsentrifuugiti kolonni kuivatamiseks kiirusel 12263 rpm (16000 x g) 2 minutit. Pärast kuivatamist asetati kolonn MB puhtasse märgistatud 1,5 ml elueerimistuubi (on komplektis kaasas). DNA elueerimiseks pipeteeriti Qiagen C6 lahust filtrimembraani keskele, inkubeeriti 1 minut toatemperatuuril ja tsentrifuugiti kiirusel 11873 rpm (15000 x g) 1 minut. Elueerimist korrati, nii et ekstrakti lõplik kogus on 100 µl.

2.2.5 DNA ekstraktide kontsentratsiooni mõõtmine

Kuna magistritöös kasutatud BEST protokollis (ingl k *Blunt end single tube protocol*, tömpide otste ühetuubiline protokoll) (Carøe et al., 2017) (vt *peatükk 2.2.6.2*) on oluline adapterite ja DNA koguste suhe (25:1), siis mõõdeti kõigi ekstraktide kontsentratsioonid. Selleks kasutati Invitrogen Qubit 4 (Thermo Fisher Scientific) fluoromeetrit, mõõtmispuhvrina kasutati Qubit 1X dsDNA HS Assay Kit (LOT 2301015). Kõigepealt mõõdeti standardid, milleks võeti kummagi standardi jaoks eraldi märgistatud tuub. Mõlemasse tuubi lisati 190 µl mõõtmispuhvrit ja lisati 10 µl vastavat standardit. Tuube segati põhjalikult vorteksil ja inkubeeriti toatemperatuuril 2 minutit. Proovi kohta võeti 199 µl mõõtmispuhvrit ja lisati 1 µl DNA ekstrakti. Segu segati vorteksil põhjalikult ja inkubeeriti toatemperatuuril 2 minutit. Seejärel teostati kolm mõõtmist iga ekstrakti kohta. Tulemused kanti tabelisse ja arvutati keskmine kontsentratsioon iga ekstrakti kohta (Lisa 1).

2.2.6 DNA raamatukogude loomine

DNA raamatukogude loomine toimus TÜ GI vana DNA laboris. Protokollides kirjeldatud kolm esimest etappi teostati vana DNA laboris. Viimase, neljanda etapi PCR segu valmistati ette vana DNA laboris ning amplifitseeriti tänapäevase DNA laboris (vältimaks vana DNA labori saastumist PCRI produktidega). Võrreldi kahte genoomsete raamatukogude valmistamise protokoll – esimeseks oli TÜ GI vana DNA laboris igapäevaselt kasutatav modifitseeritud

Meyer & Kircher (M&K) (Meyer ja Kircher, 2010) raamatukogu protokoll (Keller et al., 2023) ja teiseks valiti BEST protokoll (Carøe et al., 2017) (tabel 6). Selleks, et mõlema raamatukogu protokollid järgi tehtud tulemused oleksid võrreldavad, lisati tööplaani mõlemast protokollist pisut muudetud versioon, sest BEST protokollis on vaid üks puhastuse aste vahetult enne DNA fragmentide amplifitseerimise etappi. Meyer & Kircheri puhul kasutati lisaks tavapärasele protokollile, kuhu oli lisatud lisapuhastus enne fragmentide amplifitseerimise etappi (tabel 6). BEST protokollile lisati teine versioon ilma puhastuseta (tabel 6).

2.2.6.1 TÜ GI vana DNA labori tavaprotokoll (Meyer & Kircher, 2010).

DNA fragmentide otste täitmiseks (ER, ingl k *End Repair*) valmistati reaktsioonisegu, mis sisaldas ühe proovi kohta 5 µl 10 x *End Repair Reaction Buffer* ($C_{lõpp} = 1 \times$), 2,5 µl *End Repair Enzyme Mix* (4 U/µl *T4 DNA Polymerase*) ($C_{lõpp} = 0,2 \text{ U/}\mu\text{l}$), 10 U/µl *T4 Polynucleotide Kinase* ($C_{lõpp} = 0,5 \text{ U/}\mu\text{l}$) (NEBNext, E6050L) ja steriilset vett, mille kogus sõltub sisestatud DNA ekstrakti mahust. Reaktsioonisegu jagati 0,2 ml PCR tuubidesse ning igasse tuubi lisati sobiv maht DNA ekstrakti – hambakivi ja koproliidi esimese ekstrakti proovide puhul kasutati iga reaktsiooni läbiviimiseks 10 µl DNA ekstrakti ning 40 µl reaktsioonisegu; hammastest saadud DNA ekstraktide puhul kasutati 37 µl reaktsioonisegu, mõõdeti seejärel ekstraktide kontsentratsioon ja tehti vajalikud lahjendused, et reaktsiooniks kasutatud 13 µl ekstrakti sisaldaks sobivas koguses DNA-d (võimaldades võrdlust BEST protokolliga, kus adapterite ja DNA suhe on 25:1). Seejärel asetati proovid termotsüklerisse ja inkubeeriti neid 20 °C juures 30 minutit. Seejärel puhastati proovid reaktsioonisegu jääkidest kasutades *Minelute PCR Purification Kit*-i (Qiagen, 28006). Proov elueeriti 30 µl EB puhvriga (Qiagen, 19086).

Adapterite lisamiseks (AL, ingl k *Adaptor Ligation*) valmistati reaktsioonisegu, mis sisaldas ühe proovi kohta 10 µl 5 x *Quick Ligation Reaction Buffer* ($C_{lõpp} = 1 \times$), 5 µl 2000 U/µl *Quick T4 DNA Ligase* ($C_{lõpp} = 200 \text{ U/}\mu\text{l}$) (NEBNext, E6056L) ja kohapeal valmistatud 5 µl 2,5 µM adapterite segu ($C_{lõpp} = 0,25 \mu\text{M}$). Reaktsioonisegu jagati 20 µl kaupa 0,2 ml PCR tuubidesse ning igasse tuubi lisati 30 µl puhastatud DNA-d eelmisest reaktsioonist. Pärast seda asetati proovid termotsüklerisse ja inkubeeriti neid 20 °C juures 15 minutit ning järgnevalt puhastati proovid reaktsioonisegu jääkidest, kasutades *Minelute PCR Purification Kit*-i ja proov elueeriti uuesti 30 µl EB puhvril.

Adapterite otste täitmiseks (AF, ingl k *Adaptor Fill-in*) valmistati reaktsioonisegu, mis sisaldas ühe proovi kohta 5 µl 10 x *Thermopol Buffer* ($C_{lõpp} = 1 \times$), 5 µl 8 U/µl *Bst DNA Polymerase, Large Fragments* ($C_{lõpp} = 0,32 \text{ U/}\mu\text{l}$) (NEBNext, M0275L), 0,8 µl 4x 25mM dNTP-de segu (iga dNTP

$C_{l\ddot{o}pp} = 0,4 \text{ mM}$)(Thermo Sientific, R1122) ja 12,2 μl steriilset vett. Reaktsioonisegu jagati 20 μl kaupa 0,2 ml PCR tuubidesse ning igasse tuubi lisati 30 μl puhastatud DNA-d eelmisest reaktsioonist. Pärast seda asetati proovid termotsüklerisse ja inkubeeriti neid 37 °C juures 30 minutit ja 80 °C juures 20 minutit.

PCRi segu valmistamiseks võeti ühe proovi kohta 20 μl 10 x *HGS Reaction buffer* ($C_{l\ddot{o}pp} = 1 \times$) (Eurogentec, TAQ-I011-5000+), 20 μl 25 mM MgCl_2 lahust ($C_{l\ddot{o}pp} = 2,5 \text{ mM}$)(Eurogentec, TAQ-I011-5000+), 10 μl 20 mg/ml *Bovine Serum Albumin*-i (BSA, veise seerumi albumiin) ($C_{l\ddot{o}pp} = 0,001 \text{ mg/ml}$) (Thermo Sientific, B14), 4 μl 4x10mM dNTP-de segu (iga dNTP $C_{l\ddot{o}pp} = 0,2 \text{ mM}$) (Thermo Sientific, R0192), 4 μl 5 U/ μl *HGS Taq Diamond Polymerase* ($C_{l\ddot{o}pp} = 0,1 \text{ U}/\mu\text{l}$) (Eurogentec, TAQ-I011-5000+) ja 84 μl steriilset vett. Reaktsioonisegu jagati 142 μl kaupa PCR tuubidesse. Igasse tuubi lisati 4 μl kahte erinevat 10 μM indekseeritud praimerit ($C_{l\ddot{o}pp} = 0,2 \mu\text{M}$) (NEBNext, E7600S & E7780S). Seejärel lisati igasse tuubi 50 μl segu eelmisest reaktsioonist, segati pipetiga ja tõsteti igast segust 100 μl teise eelnevalt märgistatud PCR tuubi.

PCR-i läbiviimiseks viidi proovid tänapäevasesse laborisse ja amplifitseeriti (*Veriti 96 Well Thermal Cycler, Applied Biosystems*) järgmistel parameetritel: 1 tsükkel – eelkuumutamine 94 °C juures 5 minutit, 15 tsükli – denaturatsioon 94 °C juures 30 sekundit, praimerite seondumine 60 °C juures 30 sekundit, DNA süntees 68 °C juures 30 sekundit, 1 tsükkel – hoiti 72 °C juures 7 minutit ja jahutati 4 °C juurde. Pärast seda puhastati DNA raamatukogud, kasutades *Minelute PCR Purification Kit*-i (Qiagen). Raamatukogude sidumiseks lisati esmalt kolonnile PB puhver ja esimese tuubi sisu, tsentrifuugiti tuubid tsentrifuugil (Eppendorf, rootor FA-45-24-11) kiirusega 13000 rpm 1 minut, seejärel lisati uus kogus PB puhvrit ja teise tuubi sisu ning tsentrifuugiti tuubid tsentrifuugil kiirusega 13000 rpm 1 minut. Edasi jätkati tavapärase puhastusega. Raamatukogud elueeriti 35 μl EB puhvriga.

2.2.6.2 BEST protokoll

2.2.6.2.1 Algne BEST protokoll (Carøe et al., 2017b)

Hambakivi ja koproliidi esimese ekstrakti puhul kasutati algselt BEST protokoll (Carøe et al., 2017). ER reaktsioonisegu valmistamiseks võeti ühe proovi kohta 1,6 μl 10 x *T4 DNA Ligase Reaction Buffer* ($C_{l\ddot{o}pp} = 1 \times$) (NEBNext, B0202A), 0,1 μl 3 U/ μl *T4 DNA Polymerase* ($C_{l\ddot{o}pp} = 0,002 \text{ U}/\mu\text{l}$) (NEBNext, M0203L), 0,01 μl 10 U/ μl *T4 Polynucleotide Kinase* ($C_{l\ddot{o}pp} = 0,06 \text{ U}/\mu\text{l}$) (Thermo Sientific, EK0032), 0,3 μl 4 x 25mM dNTP-de segu (iga dNTP $C_{l\ddot{o}pp} = 0,5 \text{ mM}$) (Thermo Sientific, R1122) ja 4 μl steriilset vett. Reaktsioonisegu jagati 6 μl kaupa 0,2 ml PCR tuubidesse

ning igasse tuubi lisati 10 µl DNA ekstrakti. Seejärel asetati proovid termotsüklerisse ja inkubeeriti neid 20 °C juures 30 minutit ja 65 °C juures 30 minutit.

AL reaktsioonisegu valmistamiseks kasutati ühe proovi kohta 0,4 µl 10 x *T4 DNA Ligase Reaction Buffer* ($C_{lõpp} = 0,2 \times$) (NEBNext, B0202A), 0,1 µl 400 U/µl *T4 DNA ligase* ($C_{lõpp} = 2 \text{ U}/\mu\text{l}$) (NEBNext, M0202S) ja 2,5 µl 50% PEG 4000-st ($C_{lõpp} = 6,58\%$) (Thermo Scientific, EL0013). Kõigepealt lisati igasse ER reaktsioonituubi 1 µl eelnevalt valmistatud (vaata 2.2.6.2.1) 10 µM adapterite segu ($C_{lõpp} = 0,5 \mu\text{M}$) ja seejärel 3 µl reaktsioonisegu. Peale seda asetati proovid termotsüklerisse ja inkubeeriti neid 20 °C juures 30 minutit.

AF reaktsioonisegu valmistamiseks võeti ühe proovi kohta 3 µl 10 x *Isothermal Amplification Buffer* ($C_{lõpp} = 1 \times$) (NEBNext, B0537S), 0,5 µl 8 U/µl *Bst Polymstart 2.0 Warmstart Polymerase* ($C_{lõpp} = 0,55 \text{ U}/\mu\text{l}$) (NEBNext, M0538S), 0,3 µl 4x 25mM dNTP-de segu (iga dNTP $C_{lõpp} = 0,26 \text{ mM}$) (Thermo Scientific, R1122) ja 6,2 µl steriilset vett. Reaktsioonisegu lisati 10 µl kaupa igasse reaktsioonituubi ja saadud segu inkubeeriti termotsükleris 65 °C juures 20 minutit ja 80 °C juures 20 minutit, misjärel puhastati proovid reaktsioonisegu jääkidest, kasutades *Minelute PCR Purification Kit*-i ja proov elueeriti 30 µl EB puhvriga.

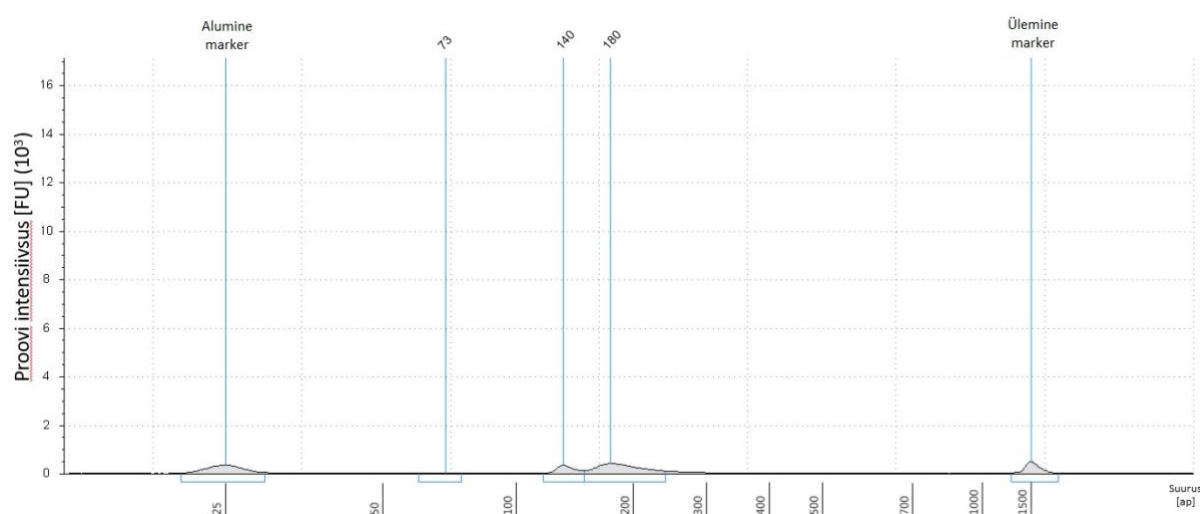
PCR segu valmistamiseks võeti ühe proovi kohta 20 µl 10 x *HGS Reaction buffer* ($C_{lõpp} = 1 \times$) (Eurogentec, TAQ-I011-5000+), 20 µl 25 mM MgCl_2 lahust ($C_{lõpp} = 2,5 \text{ mM}$) (Eurogentec, TAQ-I011-5000+), 10 µl 20 mg/ml *Bovine Serum Albumin*-i (BSA) ($C_{lõpp} = 0,001 \text{ mg}/\text{ml}$) (Thermo Scientific, B14), 4 µl 4x10mM dNTP-de segu (iga dNTP $C_{lõpp} = 0,2 \text{ mM}$) (Thermo Scientific, R0192), 4 µl 5 U/µl *HGS Taq Diamond Polymerase* ($C_{lõpp} = 0,1 \text{ U}/\mu\text{l}$) (Eurogentec, TAQ-I011-5000+) ja 104 µl steriilset vett. Reaktsioonisegu jagati 142 µl kaupa PCR tuubidesse. Igasse tuubi lisati 4 µl kahte erinevat 10 µM indekseeritud praimerit ($C_{lõpp} = 0,2 \mu\text{M}$) (NEBNext, E7600S & E7780S). Seejärel lisati igasse tuubi 30 µl puhastatud DNA-d eelmisest reaktsioonist, segati pipetiga ja tõsteti igast segust 100 µl teise eelnevalt märgistatud PCR tuubi.

PCR-i läbiviimiseks viidi proovid tänapäevasesse laborisse ja amplifitseeritakse (*Veriti 96 Well Thermal Cycler, Applied Biosystems*) järgmistel parameetritel: 1 tsükkel – eelkuumutamine 94 °C juures 5 minutit, 15 tsüklit – denaturatsioon 94 °C juures 30 sekundit, praimerite seondumine 60 °C juures 30 sekundit, DNA süntees 68 °C juures 30 sekundit, 1 tsükkel – hoiti 72 °C juures 7 minutit ja jahutati 4 °C juurde. Pärast seda puhastati DNA raamatukogud, kasutades *Minelute PCR Purification Kit*-i. Raamatukogude sidumiseks lisati esmalt kolonnile PB puhver ja esimese tuubi sisu, tsentrifuugiti tuubid tsentrifuugil (,rootor) kiirusega 13000 rpm 1 minut, seejärel lisati uus kogus PB puhvrit ja teise tuubi sisu ning tsentrifuugiti tuubid

tsentrifuugil kiirusega 13000 rpm 1 minut. Edasi jätkati tavapärase puhastusega. Raamatukogud elueeriti 35 µl EB puhvriga (Qiagen).

Saadud raamatukogude kontsentratsioonid mõõdeti (vaata 2.2.7) Qubit 2.0 Fluoromeetriga (*Invitrogen by life technologies*) ja DNA fragmentide pikkused määrati *Agilent Technologies 2200 TapeStation* elektroforeesimasinaga (*Agilent Technologies, Inc.*).

Saadud tulemustest selgus, et koostatud raamatukogudes oli raamatukogu sisaldus väga madal ning see sisaldas vabu primereid ja nende dimeere, mis moodustasid mõõdetud kontsentratsioonist üsna suure osa (joonis 15).

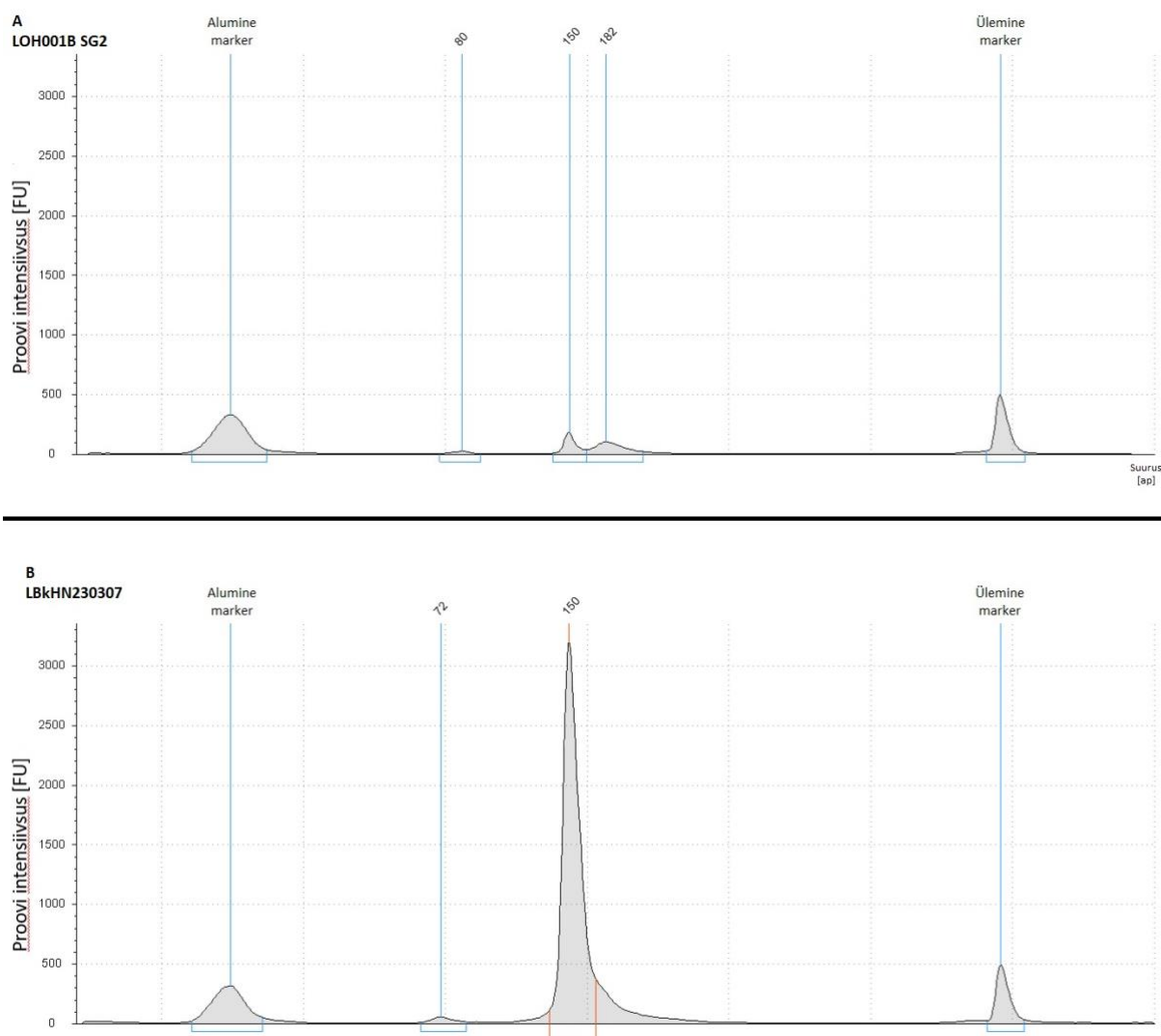


Joonis 15. BEST protokoll (Carøe et al., 2017) järgi loodud raamatukogu pikkusjaotus, mõõdetud *Agilent TapeStation Systems*-ga. Raamatukogu asub 180 aluspaari juures. Lisapiigid sisaldavad primereid ja nende dimeere.

2.2.6.2.2 BEST protokoll modifitseerimine

Saadud tulemustest tingituna uuendati BEST protokoll edasiseks tööks, võttes arvesse artiklites (Mak et al., 2017) ja (Kapp et al., 2021) kasutusele võetud modifikatsioone.

Enne muudetud protokoll kasutusele võtmist testiti muudatusi proovi LOH001B ekstraktiga, millest varasemalt oli juba Meyer & Kircher protokoll kasutades raamatukogu loodud (kontsentratsiooniga 10,2 ng/µl).



Joonis 16. BEST protokoll (Carøe et al., 2017) järgi loodud raamatukogu pikkusjaotus, mõõdetud *Agilent TapeStation Systems*-ga. A: Raamatukogu asub 182 aluspaari juures, lisapiigid sisaldavad praimereid ja nende dimeere; B: Negatiivses kontrollis sisalduvad praimerid ja nende dimeerid.

Esialgselt katsetasime valitud prooviga algset BEST protokoll. Saadud tulemused on näha järgmistel joonisel 16. Nii proovis kui negatiivses kontrollis on näha praimereid (graafikul tipp 80/72 aluspaari (ap)) ja nende dimeere (graafikul tipp 150 ap), mis segaksid saadud raamatukogu sekveneerimist.

Edasi reamplifitseeriti (vaata 2.2.6.2.3) saadud raamatukogu kasutades *KAPA HiFi HotStart ReadyMix*-i (Roche), et raamatukogu kontsentratsiooni tõsta. Reamplifitseerimise tulemusena tõusis raamatukogu kontsentratsioon 0,117 ng/μl-lt 5,48 ng/μl-s, kuid samuti suurenes ka dimeeride kontsentratsioon 0,0874 ng/μl-lt 3,02 ng/μl-s.

Teises katses võeti (Mak et al., 2017) ja (Kapp et al., 2021) modifikatsioonidest lähtudes kasutusele reaktsioonivõimendi (vaata 2.2.6.2.2), mida võeti proovi kohta 1 μl, ja sisestuseks

võetava DNA ekstrakti kogus tõsteti 13 µl peale, sealjuures jälgides, et raamatukogude loomisel kasutatud adapterite ja DNA moolide arvude suhe oleks 25:1. Selleks, et teada saada DNA kogus kasutatavas ekstraktis, mõõdeti selle kontsentratsioon Invitrogen Qubit 4 (Thermo Fisher Scientific) fluoromeetril ning saadud tulemus oli 0,236 ng/µl. Artiklis (Kapp et al., 2021) oli toodud sisestatava DNA koguseks 0,4 pmol, millele vastab antud protokollis suhtes 1:25 1 µl 10 µM adapterite segu, kuid meie testproovi puhul oli sisestatava DNA kogus 13 µl ekstraktis vaid 0,094pmol, Seetõttu tuli teha lahjendus adapterite segule, milleks võeti 5 µl esialgset adapterite segu ja 16,2 µl steriilset vett. Saadud adapterite segu kontsentratsioon oli 2,36 µM ($C_{lõpp} = 0,12 \text{ µM}$). Kuna suurendati sisestatava DNA ekstrakti kogust ja lisati reaktsioonivõimendi, siis jäeti ER reaktsioonisegust välja steriilne vesi.

ER reaktsioonisegu valmistamiseks võeti ühe proovi kohta 1 µl reaktsioonivõimendit (vaata 2.2.6.2.2), 1,6 µl 10 x *T4 DNA Ligase Reaction Buffer* ($C_{lõpp} = 1 \text{ x}$) (NEBNext, B0202A), 0,01 µl 3 U/µl *T4 DNA Polymerase* ($C_{lõpp} = 0,002 \text{ U/µl}$) (NEBNext, M0203L), 0,1 µl 10 U/µl *T4 Polynucleotide Kinase* ($C_{lõpp} = 0,06 \text{ U/µl}$) (Thermo Scientific, EK0032) ja 0,3 µl 4 x 25 mM dNTP-de segu (iga dNTP $C_{lõpp} = 0,5 \text{ mM}$) (Thermo Sientific, R1122). Reaktsioonisegu jagati 3 µl kaupa 0,2 ml PCR tuubidesse ning igasse tuubi lisati 13 µl DNA ekstrakti (0,094 mol DNA-d). Seejärel asetati proovid termotsüklerisse ja inkubeeriti neid 20 °C juures 30 minutit ja 65 °C juures 30 minutit.

AL reaktsioonisegu valmistamiseks kasutati ühe proovi kohta 0,4 µl 10 x *T4 DNA Ligase Reaction Buffer* ($C_{lõpp} = 0,2 \text{ x}$) (NEBNext, B0202A), 0,1 µl 400 U/µl *T4 DNA ligase* ($C_{lõpp} = 2 \text{ U/µl}$) (NEBNext, M0202S) ja 2,5 µl 50% PEG 4000 ($C_{lõpp} = 6,58\%$) (Thermo Scientific, EL0013). Kõigepealt lisati igasse ER reaktsioonituubi 1 µl eelnevalt valmistatud (vaata 2.2.6.2.1) 2,36 µM adapterite segu ($C_{lõpp} = 0,12 \text{ µM}$) ja seejärel 3 µl reaktsioonisegu. Seejärel asetati proovid termotsüklerisse ja inkubeeriti neid 20 °C juures 30 minutit ja 65 °C juures 10 minutit.

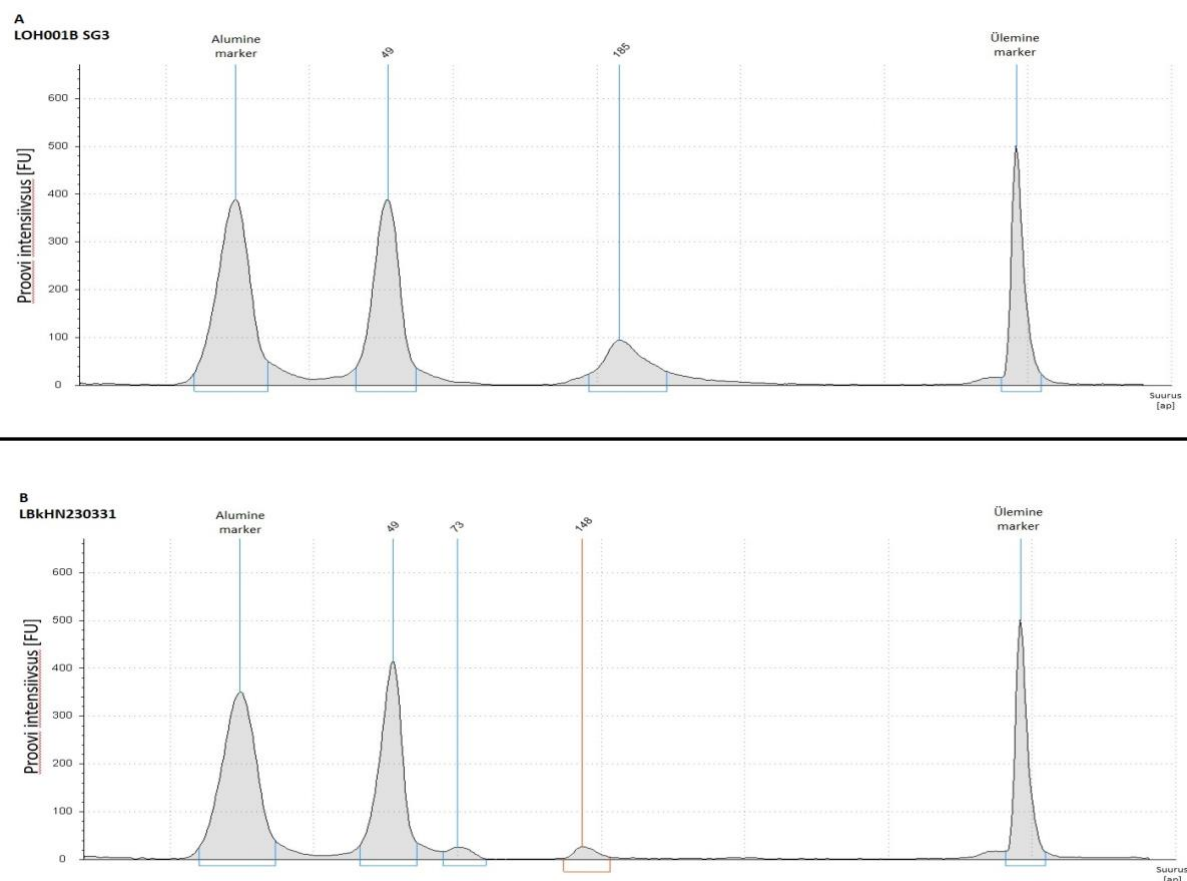
AF reaktsioonisegu valmistamiseks võeti ühe proovi kohta 3 µl 10 x *Isothermal Amplification Buffer* ($C_{lõpp} = 1 \text{ x}$) (NEBNext, B0537S), 0,5 µl 8 U/µl *Bst Polymstart 2.0 Warmstart Polymerase* ($C_{lõpp} = 0,55 \text{ U/µl}$) (NEBNext, M0538S), 0,3 µl 4x 25 mM dNTP-de segu (iga dNTP $C_{lõpp} = 0,26 \text{ mM}$) (Thermo Sientific, R1122) ja 6,2 µl steriilset vett. Reaktsioonisegu lisati 10 µl kaupa igasse reaktsioonituubi ja saadud segu inkubeeriti termotsükleris 65 °C juures 20 minutit ja 80 °C juures 20 minutit ning proovid puhastati reaktsioonisegu jääkidest, kasutades *Minelute PCR Purification Kit*-i ja proov elueeriti 40 µl EB puhvriga.

PCR segu valmistamiseks kasutati artiklites välja toodud *AmpliTaq Gold™ DNA Polymerase with Gold Buffer and MgCl₂* polümeraasi. Reaktsioonisegu valmistamiseks võeti ühe proovi

kohta 10 µl 10 x *AmpliTaq Gold buffer* ($C_{l\ddot{o}pp} = 1 \times$) (*Applied Biosystems*), 10 µl 25 mM $MgCl_2$ lahust ($C_{l\ddot{o}pp} = 2,5 \text{ mM}$) (*Applied Biosystems*), 2 µl 20 mg/ml *Bovine Serum Albumin*-i (BSA) ($C_{l\ddot{o}pp} = 0,8 \text{ µg/µl}$) (Thermo Sientific, B14), 0,8 µl 4x 25 mM dNTP-de segu (iga dNTP $C_{l\ddot{o}pp} = 0,2 \text{ mM}$) (Thermo Sientific, R0192), 2 µl 5 U/µl *AmpliTaq Gold polymerase* ($C_{l\ddot{o}pp} = 0,1 \text{ U/µl}$) (*Applied Biosystems*) ja 51,2 µl steriilset vett. Reaktsioonisegu jagati 142 µl kaupa PCR tuubidesse. Igasse tuubi lisati 2 µl kahte erinevat 10 µM indekseeritud praimerit ($C_{l\ddot{o}pp} = 0,2 \text{ µM}$) (NEBNext, E7600S & E7780S). Seejärel lisatie igasse tuubi 20 µl puhastatud DNA-d eelmisest reaktsioonist.

PCR-i läbiviimiseks viidi proovid tänapäevasesse laborisse ja amplifitseeriti (*Veriti 96 Well Thermal Cycler, Applied Biosystems*) järgmistel parameetritel: 1 tsükel – eelkuumutamine 95 °C juures 12 minutit, 15 tsüklit – denaturatsioon 95 °C juures 30 sekundit, praimerite seondumine 60 °C juures 30 sekundit, DNA süntees 72 °C juures 40 sekundit, 1 tsükel – hoiti 72 °C juures 5 minutit ja jahutati 4 °C juurde. Pärast seda puhastati DNA raamatukogud, kasutades *Minelute PCR Purification Kit*-i. Raamatukogud elueeriti 35 µl EB puhvriga (Qiagen). Saadud raamatukogude kontsentratsioonid mõõdeti (vaata 2.2.7) Qubit 2.0 Fluoromeetriga (*Invitrogen by life technologies*) ja DNA fragmentide pikkused määrati *Agilent TapeStation Systems* (*Agilent Technologies, Inc.*) elektroforeesimasinaga (joonis 17).

Jooniselt 17 on näha, et proovis ei sisaldu enam vabu praimereid ega nende dimeere, mis negatiivses kontrollis jätkuvalt esinevad. Juurde on tekkinud lisapiik 49 ap juures ja see sisaldub nii proovis kui ka negatiivses kontrollis. Kontrollimaks, et antud piik ei ole saastus, viidi läbi reagentide kontroll. Selleks lisati DNA ekstrakti asemel reagentide segusse steriilset vett. Kontroll viidi läbi põhimõttel, mis on näidatud tabelis 6.

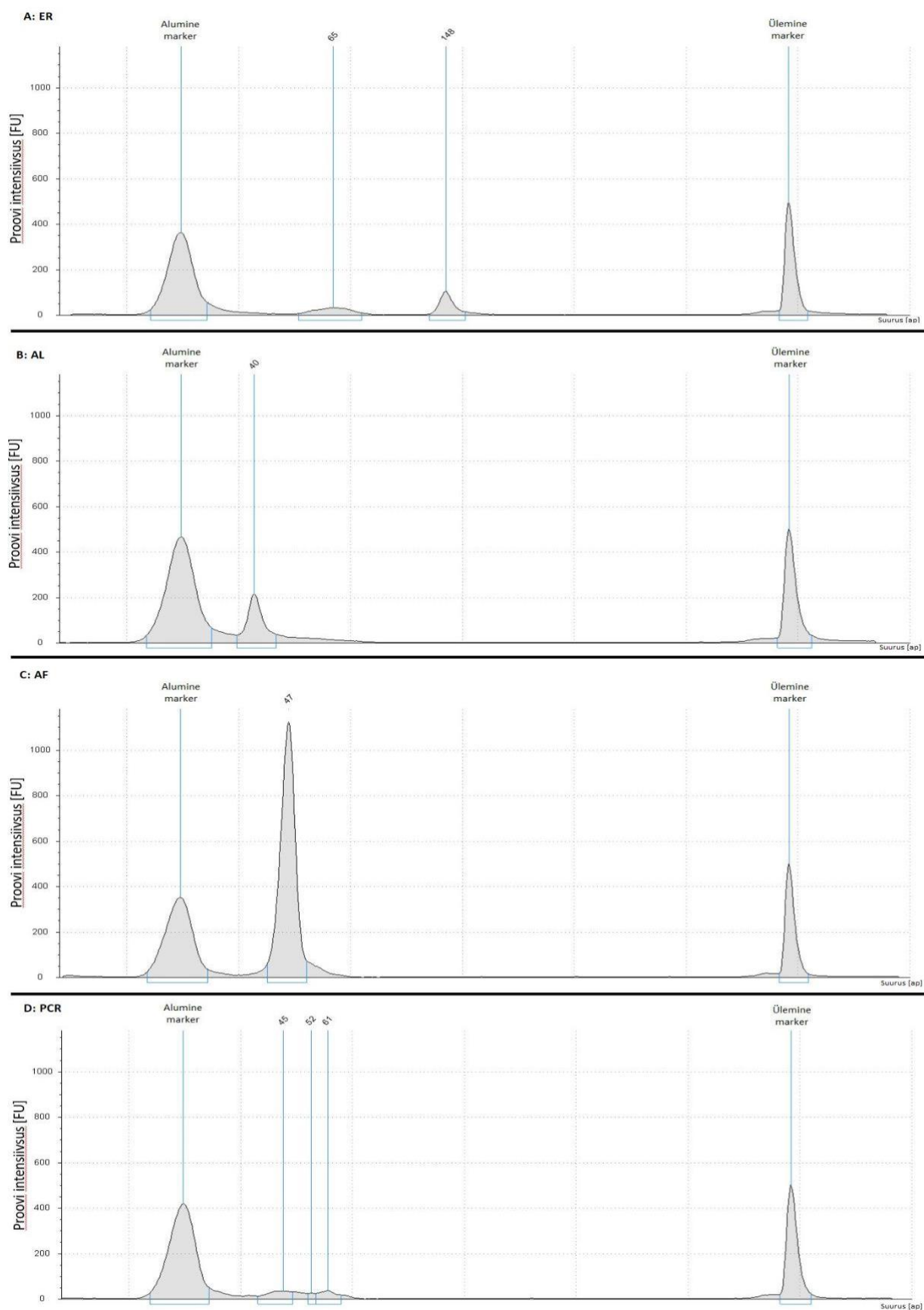


Joonis 17. Modifitseeritud BEST protokoll (Carøe et al., 2017; Kapp et al., 2021; Mak et al., 2017) järgi loodud raamatukogu pikkusjaotus, mõõdetud *Agilent TapeStation Systems*-ga. A: Raamatukogu asub 185 aluspaari juures, identifitseerimatu lisapiik 49 aluspaari juures; B: Negatiivses kontrollis sisalduvad praimerid ja nende dimeerid ning lisapiik 49 aluspaari juures.

Tabel 6. Modifitseeritud BEST protokollis kasutatud reagentide test. ER – fragmentide otste täitmine, AL – adapterite ligeerimine, AF – adapterite otste täitmine, PCR – polümeraasi ahelreaktsioon.

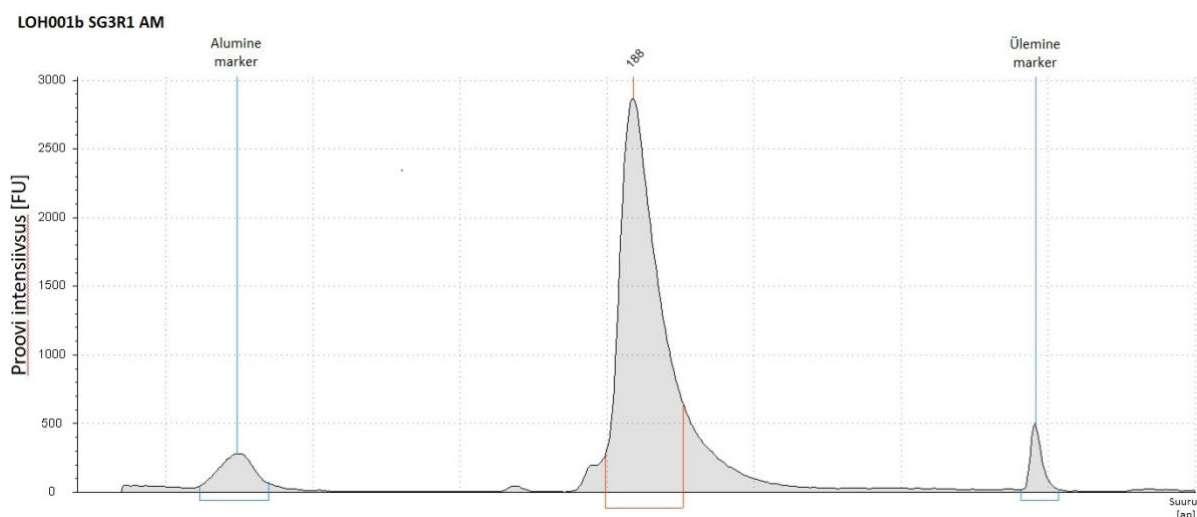
Tuub 1	Tuub 2	Tuub 3	Tuub 4
ER + vesi			
AL	AL + vesi		
AF	AF	AF + vesi	
puhastus	puhastus	puhastus	
PCR	PCR	PCR	PCR + vesi

Saadud tulemused on näha alltoodud joonisel 18. Kuna kõnealune piik esineb osades tuubides, kuid mitte teistes, mis sisaldavad samu reagente, võib järeldada, et tegemist ei ole saastusega, vaid protsessi läbiviimisel tekib liigsetest praimeritest kimäärne moodustis.



Joonis 18. Modifitseeritud BEST protokoll (Carø et al., 2017; Kapp et al., 2021; Mak et al., 2017) järgi loodud raamatukogu pikkusjaotus, mõõdetud *Agilent TapeStation Systems*-ga.
A: ER – fragmentide otste täitmine, B: AL – adapterite ligeerimine, C: AF – adapterite otste täitmine, D: PCR – polümeraasi ahelreaktsioon.

Järgmiseks prooviti tekkinud lisapiiki raamatukogust eemaldada. Selleks tõsteti raamatukogu kontsentratsiooni kasutades reamplifitseerimist (vaata 2.2.6.2.3) ning piigi eemaldamiseks kasutati AMPure XP kerakesi (vaata 2.2.6.2.4). Lisapiigi eemaldamine oli edukas (joonis 19) ja ei vähendanud seejuures kuigivõrd raamatukogu kontsentratsiooni.



Joonis 19. Modifitseeritud BEST protokoll (Carøe et al., 2017; Kapp et al., 2021; Mak et al., 2017) järgi loodud raamatukogu pikkusjaotus, mõõdetud *Agilent TapeStation Systems*-ga. Reamplifitseeritud ja kerakestega puhastatud proov jooniselt 16A.

2.2.6.2.3 Genoomsete raamatukogude valmistamise protokollide võrdlus

Saadud tulemustest lähtudes kasutati hammastest saadud ekstraktidest raamatukogude loomiseks modifitseeritud BEST protokoll ja TÜ GI vana DNA laboris igapäevaselt kasutatavat modifitseeritud Meyer & Kircher (M&K) protokoll (tabel 7, Lisa 2). Enne raamatukogude loomist mõõdeti ekstraktide kontsentratsioonid (vaata 2.2.5). Saadud tulemusi kasutati BEST protokollis sisestatavate DNA koguste ja neist tulenevate adapterite segu lahjenduste arvutamiseks – ühte proovi võeti maksimaalne kogus ehk 0,015 pmol, ühte 0,046 pmol, kahte 0,123 pmol ja kahte 0,4 pmol (tabel 8).

Tabel 7. Genoomsete raamatukogude valmistamise protokollide võrdlus. TÜ GI vana DNA laboris igapäevaselt kasutatav modifitseeritud Meyer & Kircher (M&K) (Meyer ja Kircher, 2010) raamatukogu protokoll (Keller et al., 2023), sama protokoll lisapuhastusega, modifitseeritud BEST protokoll (Carøe et al., 2017; Kapp et al., 2021; Mak et al., 2017) ja sama protokoll puhastusega.

Reagendid ja nende alkkontsentratsioonid	M&K	M&K + lisapuhastus	Modifitseeritud BEST	Modifitseeritud BEST puhastuseta	Reagendid ja nende alkkontsentratsioonid
1 Fragmentide otste täitmine, inkubeeritakse 30 min - 20 ° C juures	Kogus tuubi kohta (μl)	Kogus tuubi kohta (μl)	Kogus tuubi kohta (μl)	Kogus tuubi kohta (μl)	1 Fragmentide otste täitmine, inkubeeritakse 30 min - 20 ° C juures ja 30 min - 65 ° C juures
DNA ekstrakt	13	13	13	13	DNA ekstrakt
Steriilne vesi	29.5	29.5	0	0	Steriilne vesi
End Repair Reaction Buffer (10x)	5	5	1	1	Reaktsioonivõimendi
End Repair Enzyme Mix (T4 DNA Polymerase (4 U/μl), T4 Polynucleotide Kinase (10 U/μl))	2.5	2.5	0.01	0.01	T4 DNA Polymerase (3 U/μl),
Puhastus	Puhastus	Puhastus	0.1	0.1	T4 Polynucleotide Kinase (10 U/μl)
			1.6	1.6	T4 DNA Ligase Reaction Buffer (10 x)
			0.3	0.3	dNTP-d (iga dNTP 25 mM)
2 Adapterite ligeerimine, inkubeeritakse 15 min - 20 ° C juures	Kogus tuubi kohta (μl)	Kogus tuubi kohta (μl)	Kogus tuubi kohta (μl)	Kogus tuubi kohta (μl)	2 Adapterite ligeerimine, inkubeeritakse 30 min - 20 ° C juures ja 10 min - 65 ° C juures
Puhastatud DNA eelmisest reaktsioonist	30	30	16.01	16.01	Fragmendi otste täitmise reaktsioonisegu koos DNA-ga
Quick Ligation Reaction Buffer (5x)	10	10	1	1	BEDC3 adapterite segu
Adaptor mix (2.5 μM)	5	5	2.5	2.5	PEG 4000-st (Sigma Aldrich, 50%)
Quick T4 DNA Ligase (2,000 U/μl)	5	5	0.4	0.4	T4 DNA Ligase Reaction Buffer (10x)
Puhastus	Puhastus	Puhastus	0.1	0.1	T4 DNA ligase (400 U/μl)
3 Adapterite otste täitmine, inkubeeritakse 30 min - 37 ° C juures ja 20 min - 80 ° C juures	Kogus tuubi kohta (μl)	Kogus tuubi kohta (μl)	Kogus tuubi kohta (μl)	Kogus tuubi kohta (μl)	3 Adapterite otste täitmine, inkubeeritakse 20 min - 65 ° C juures ja 20 min - 80 ° C juures
Puhastatud DNA eelmisest reaktsioonist	30	30	20.01	20.01	Adapteri ligeerimise reaktsioonisegu koos DNA-ga
Steriilne vesi	12.2	12.2	0.3	0.3	dNTP-d (iga dNTP 25 mM)
Thermopol Buffer (10x)	5	5	3	3	Isothermal Amplification Buffer (10x)
dNTP-d (iga dNTP 25 mM)	0.8	0.8	6.2	6.2	Steriilne vesi
Bst DNA Polymerase, LF (8 U/μl)	2	2	0.5	0.5	Bst Polymstart 2.0 Warmstart Polymerase (8 U/μl)
Puhastus	Puhastus	Puhastus	Puhastus	Puhastus	
4 DNA-fragmentide amplifitseerimine	Kogus tuubi kohta (μl)	Kogus tuubi kohta (μl)	Kogus tuubi kohta (μl)	Kogus tuubi kohta (μl)	4 DNA-fragmentide amplifitseerimine
Steriilne vesi	42	42	51.2	51.2	Steriilne vesi
10x PCR buffer	10	10	10	10	AmpliTaQ Gold buffer (Applied Biosystems)(10x)
MgCl (25 mM)	10	10	10	10	MgCl (25 mM)
BSA (20 mg/ml)	5	5	2	2	BSA (20 μg/μl)
dNTP-d (iga dNTP 10 mM)	2	2	0.8	0.8	dNTP-d (iga dNTP 25 mM)
HGS Taq Diamond (5 U/μl)	2	2	2	2	AmpliTaQ Gold polymerase (5 U/μl)
PCR tsükleri programm: #1 + kaane kuumutamine					
Etap	Aeg [min:sec]	Temperatuur [°C]			Tsükli arv
Eelkuumutamine	12:00	95			1
Denaturatsioon	00:30	95			15
Praimerite seondumine	00:30	60			
DNA süntees	00:40	72			
Hoidmine	05:00	72			1
Jahutamine	∞	4			1

PCR tsükleri programm: #1 + kaane kuumutamine					
Etap	Aeg [min:sec]	Temperatuur [°C]			Tsükli arv
Eelkuumutamine	12:00	95			1
Denaturatsioon	00:30	95			15
Praimerite seondumine	00:30	60			
DNA süntees	00:40	72			
Hoidmine	05:00	72			1
Jahutamine	∞	4			1

Tabel 8. Hammastest eraldatud ekstraktide ja modifitseeritud BEST protokollis kasutatava adapteri segu lahjendused. Modifitseeritud BEST protokollis nõutud adapterite ja DNA suhe 25:1.

Proovi ID	DNA ekstraktid kontsentratsioon (ng/μl)	Kasutatav DNA kogus raamatu-kogu kohta (ng)	Maht ühe raamatu-kogu kohta (μl)	DNA ekstrakti moolide arv (pmol)	Adapteri segu moolide arv (pmol)	Adaperi-segu lõppkontsentratsioon AL reaktsiooni segus (μM)	10 μM adapteri-segu maht (μl)	Adapteri-segu lahjenduse lõppmaht (μl)	10 μM adapterisegu maht lahjenduses (μl)
TAA004A	0.037	0.48	13.00	0.015	0.367	0.02	0.04	15	0.55
KOY002A	0.119	1.50	12.57	0.046	1.154	0.06	0.12	10	1.15
TAA003A	0.321	4.00	12.47	0.123	3.077	0.15	0.31	10	3.08
TAA005A	0.376	4.00	10.64	0.123	3.077	0.15	0.31	10	3.08
TAA002A	1.873	13.00	6.94	0.400	10.000	0.50	1.00		
KOY001A	4.287	13.00	3.03	0.400	10.000	0.50	1.00		

2.2.6.2.4 Adapterite segu valmistamine

Adapterite segu valmistamiseks tuli kõigepealt leida parim meetod tuubide inkubeerimiseks 95 °C juures 10 sekundit ning jahutamiseks 95 °C-st 12°C-ni kiirusega 0,1 °C sekundis, mille käigus hübridiseeritakse praimerid IS1 ja IS3_BEDC3 ning IS2 ja IS3_BEDC3 omavahel. Testimiseks kasutasime *Eppendorf ThermoMixer C* 1,5 ml tuubidele mõeldud kuupaploki, kahte 25 μl vett sisaldavat 0,5 ml tuubi, termomeetrit (0-100 °C) ja stopperit. Kõigepealt sisestasime seadmesse programmi, mis tõstis temperatuuri 95 °C-ni ja hoidis seda 10 sekundit ja see järel jahutas 12 °C-ni ning hoidis seda 10 sekundit. Jahutamiseks kulutatud aeg fikseeriti iga viie langenu kraadi järel (95 °C, 90 °C, 85 °C, ..., 15 °C, lõpuks 12 °C). Saadud tulemuste põhjal arvutati, keskmiselt mitu kraadi ühes sekundis temperatuur langes, ja hinnati, kas langus oli ühtlane. Temperatuur langes keskmiselt kiirusega 0.045 °C/sek ning kõrgematel temperatuuridel oli langus veidi kiirem ja madalamatel aeglasem, kuid kõikumised ei olnud väga suured. Tulemuse võis lugeda rahuldavaks, sest jahutamine võib toimuda pigem aeglasemalt, kui ette nähtud: liiga kiirel jahtumisel on adapterite hübridisatsioon mittetäielik ning võivad tekkida kimäärid.

Esimene tuub adapterite segu valmistati käsitsi. Selleks märgistati kaks tuubi numbritega 1 (adapter P7) ja 2 (adapter P5). Mõlemasse tuubi lisati 2,5 μl 10 x oligohübridisatsioonipuhvrit ($C_{lõpp} = 1 \times$) ja 12,5 μl steriilset vett. Tuubi number 1 (adapter P7) lisati 5 μl 100 μM praimerit IS2 ($C_{lõpp} = 20 \mu\text{M}$) ning 5 μl 100 μM praimerit IS3_BEDC3 ($C_{lõpp} = 20 \mu\text{M}$) ja tuubi number 2 (adapter P5) lisati 5 μl 100 μM praimerit IS1 ($C_{lõpp} = 20 \mu\text{M}$) ning 5 μl 100 μM praimerit IS3_BEDC3 ($C_{lõpp} = 20 \mu\text{M}$). Mõlema tuubi sisu segati pipetiga ja tsentrifuugiti lauatsentrifuugiga kergelt tuubi põhja. Järgmiseks asetati mõlemad tuubid termotsüklerisse 95 °C juurde 10 sekundiks ning seejärel tõsteti mõlemad tuubid eelnevalt 95 °C juurde

soojendatud termoplokki ning jahutati käsitsi temperatuuri alandades kuni temperatuurini 24 °C, järgmiseks tõsteti mõlemad tuubid külmikusse ja hoiti seal 5 minutit. Pärast seda segati omavahel mõlema tuubi sisud ja 50 µl steriilset vett ja saadi adapterite segu kontsentratsiooniga 10 µM. Teine tuub adapterite segu valmistati kuni hübridiseerimisetapini samamoodi kui esimene tuub, kuid hübridiseerimine viidi läbi *Eppendorf ThermoMixer C*-ga, nagu on kirjeldatud esimeses lõigus.

Adapterite segu kvaliteedi kontrollimiseks kasutati *Agilent TapeStation Systems (Agilent Technologies, Inc.)* elektroforeesimasinat. Võrdluseks kasutati TÜ GI vana DNA laboris igapäevaselt kasutatavat adapterite segu. Meyer & Kircheri protokollis kasutatava adapterite segu pikkuseks oli 37 ap, esimese käsitsi valmistatud BEST protokollis adapterite segu pikkuseks oli 38 ap ja teisel 37 ap. Kõigi kolme adapterisegu piikide kujud ja pikkused olid sarnased, nii et adapterisegu kvaliteediga jäädi rahule.

2.2.6.2.5 Reaktsioonivõimendi valmistamine

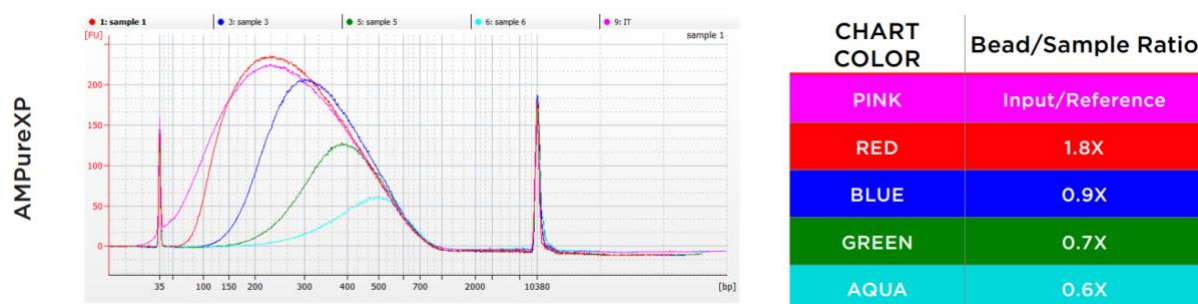
Reaktsioonivõimendi valmistamiseks segati 20 µl 50% PEG 4000 (Sigma Aldrich), 5 µl 20 µg/µl BSA-d (Thermo Scientific), 4 µl 5 M NaCl ja 21 µl steriilset vett. Saadud segu tsentrifuugiti lauatsentrifuugil.

2.2.6.2.6 Reamplifitseerimine

Reamplifitseerimiseks valmistati reaktsioonisegu, mille jaoks võeti ühe proovi kohta 15 µl 2X *KAPA Hifi Hotstar ReadyMix* ($C_{lõpp} = 1 \times$), 1,5 µl 10 µM praimer IS6 ($C_{lõpp} = 0,5 \mu\text{M}$), 1,5 µl 10 µM praimer IS5 ($C_{lõpp} = 0,5 \mu\text{M}$) ja 2 µl steriilset vett. Saadud segu jaotati 20 µl kaupa PCR tuubidesse, igasse tuubi lisati 10 µl raamatukogu ja tuubid asetati PCR-i masinasse (*Veriti 96 Well Thermal Cycler, Applied Biosystems*). PCR-i jooksutati järgmistel parameetritel: 1 tsükkel – eelkuumutamine 98 °C juures 2 minutit, 8 tsükli – denaturatsioon 98 °C juures 20 sekundit, praimerite seondumine 60 °C juures 30 sekundit, DNA süntees 72 °C juures 30 sekundit, 1 tsükkel – hoiti 72 °C juures 5 minutit ja jahutati 4 °C juurde. Pärast seda puhastati DNA raamatukogud, kasutades *Minelute PCR Purification Kit*-i. Raamatukogud elueeriti 32 µl eelnevalt 65 °C soojendatud EB puhvriga (Qiagen), mida lisati kahes jaos 16 µl, vahepeal tsentrifuugides, ning inkubeeriti laual 10 minutit mõlemal korral.

2.2.6.2.7 PCR produkti puhastamine AMPure kerakestega

Enne AMPure kerakestega (AMP) PCR-i produkti puhastamist arvutati välja, millist kogust kerakesi vajatakse. Selleks on tootja firma poolt antud soovitused (joonis 20).



Joonis 20. AMPure XP. Sobivate DNA fragmentide puhastamiseks vajaminevate kerakeste kogus sõltuvuses eemaldatavate fragmentide pikkusega (*AMPure XP, PCR Purification Reagent – Beckman Coulter, 2023*).

Antud töös kasutati AMP-i modifikatsioonidega BEST test-raamatukogu puhastamiseks, milleks oli sobilik kasutada DNA raamatukoguga võrreldes 1,8 korda rohkem AMP-i. AMP võeti kõigepealt toatemperatuurile soojenema 30 minutit enne kasutamist. Alustuseks valmistati etanooli 80% lahus (peab olema valmistatud värskelt samal päeval), milleks võeti 808,08 µl 99% etanooli kuhu lisati 191,92 µl steriilset vett. Seejärel tsentrifuugiti proovid ja pipeteeriti 20 µl proovi eelnevalt märgistatud 1,5 ml Eppendorf LoBind tuubidesse. AMP segati vorteksil 30 sekundit, et suspensioon oleks ühtlaselt segunenud. Edasi pipeteeriti 36 µl AMP-i igasse tuubi. Iga tuubi segati pipetiga ettevaatlikult 10 korda ning inkubeeriti toatemperatuuril ilma raputamata 5 minutit, et sobiva pikkusega DNA fragmendid kinnituksid AMP-ile. Järgmiseks asetati tuubid magneetilisele tuubihoidikule ja hoiti seal ilma puutumata 2 minutit (või kuni supernatant oli selge), kuni moodustus tuubi küljele väike “mummuke”. Tuube ei liigutatud magneetiliselt tuubihoidikult. Nüüd eemaldati pipetiga ettevaatlikult supernatant ja visati see ära. Järgmiseks pesti AMP 80% etanooliga, lisades 200 µl etanooli lahust ettevaatlikult AMP-ile ning inkubeerides toatemperatuuril 30 sekundit ja seejärel eemaldati etanool ettevaatlikult. Puhastust korrati teist korda. Etanooli jääkide eemaldamiseks hoiti tuube kaas avatuna 10 minutit (vältida AMP-i muutumist valgeks) toatemperatuuril. Nüüd võeti tuubid magneetiliselt tuubihoidikult ja lisati igasse tuubi 20 µl EB puhvrit (Qiagen) ning segati pipetiga ettevaatlikult 10 korda, et AMP segunek ühtlaselt. Inkubeeriti toatemperatuuril 2 minutit, misjärel asetati tuubid uuesti magneetilisele tuubihoidikule ja hoiti neid seal 2 minutit, kuni tuubi küljele moodustus väike “mummuke”. Supernatant viidi pipetiga üle eelnevalt märgistatud uude 1,5 ml Eppendorf LoBind tuubi.

2.2.7 DNA raamatukogude kontsentratsiooni ja fragmentide pikkuste mõõtmine

Saadud raamatukogude kontsentratsioonide mõõtmiseks kasutati *Qubit 2.0 Fluorometer* (*Invitrogen by life technologies*) (mõeldud korraga ühe proovi mõõtmiseks) ja *Qubit™ Flex Fluorometer* (*Invitrogen by life technologies*) (mõõdab korraga kaheksa proovi). Enne mõõtmise algust tõsteti standardlahused toatemperatuurile ja inkubeeriti neid 30 minutit. Samal ajal valmistati ette tuubid ja mõõtmispuhver, milleks võeti ühe proovi kohta 199 µl *Qubit™ dsDNA HS Buffer* (*Invitrogen by life technologies*, Q32854) ja 1 µl *200X in DMSO Qubit™ dsDNA HS Reagent* (*Invitrogen by life technologies*, Q32854). Saadud segu lisati mõlemasse standardlahuse tuubi 190 µl ja proovi tuubidesse 199 µl. *Qubit™ Flex Fluorometer* puhul kasutati 8 tuubiseid ribasid, üht neist ka standardite jaoks. Pärast inkubeerimist lisati kumbagi standardi tuubi vastavat standardit 10 µl, segati vorteksil ja hoiti toatemperatuuril 2 minutit. Seejärel mõõdeti kõigepealt *Qubit™ dsDNA HS Standard #1* (0 ng/µL, TE puhver) ja siis *Qubit™ dsDNA HS Standard #2* (10 ng/µL, TE puhver)s. Järgmiseks lisati igasse valmis pandud mõõtmispuhvriga tuubi 1 µl vastavat proovi, segati vorteksil põhjalikult ja inkubeeriti toatemperatuuril 2 minutit. Iga proovi mõõdeti kaks korda ja saadud tulemustest arvutati iga proovi kohta keskmine kontsentratsioon.

DNA fragmentide pikkused määrati *Agilent Technologies 2200 TapeStation* elektroforeesimasinaga (*Agilent Technologies, Inc.*). DNA fragmentide pikkuste määramisel on oluline proovi kontsentratsioon – proovid kontsentratsiooniga ≤ 10 ng/µl mõõdetakse, kasutades *High Sensitivity D1000 Reagents* (*Agilent Technologies, Inc.*, 5067-5585) ja *High Sensitivity D1000 ScreenTape* (*Agilent Technologies, Inc.*, 5067-5584), ning proovid kontsentratsiooniga >10 ng/µl mõõdetakse, kasutades *D1000 Reagents* (*Agilent Technologies, Inc.*, 5067-5583) ja *D1000 ScreenTape* (*Agilent Technologies, Inc.*, 5067-5582). *High Sensitivity D1000* kiti korral võetakse 2 µl laadimispuhvrit ja lisatakse 2 µl proovi (või markerit), *D1000* kiti puhul võetakse 3 µl laadimispuhvrit ja lisatakse 1 µl proovi (või markerit). Markerit võib jätta lisamata, kui proove on paarisarv, ning selle asemel võib lisada seadmest elektroonilise markeri. Kui proovid on laadimispuhvriga kokku pipeteeritud, segati tuube vorteksil ja tsentrifuugiti. Tuubid asetati masinasse, lisati pipetiotsikud ja *ScreenTape*. Järgmiseks lisati masinasse proovide nimetused ja käivitati programm.

2.2.8 DNA Sekveneerimine

Sekveneerimiseks tegi TÜ GI tuumiklabori teise põlvkonna sekveneerimise spetsialist Anu Solnik mõõdetud proovi kontsentratsioonide ja ap pikkuste järgi vajalikud lahjendused ning

määras proovide täpsed kontsentratsioonid kvantitatiivse PCR-iga (qPCR, *Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System*). Saadud tulemusi kasutas ta proovide võrdseks kokkusegamiseks 20 kaupa. Saadud DNA raamatukogude segud (ingl. k. *pool*) sekveneeriti TÜ GI tuumiklaboris *shotgun*-meetodil *Illumina NextSeq 500* platvormil 150 ap kummastki otsast (High 150 PE, ingl k *paired-end*).

2.2.9 Bioinformaatiline analüüs

Kõigi proovide sekveneeritud järjestused joondati inimese referentsgenoomi järjestusele ning viidi läbi *in silico* kvaliteedikontroll, mis toimus TÜ nooremteadur Kadri Irdti juhendamisel TÜ Teadusarvutuste keskuse serveris programmi *Putty* (<https://www.putty.org/>) vahendusel. Hilisem metagenoomne analüüs pinnase-, koproliidi-, hambakivi- ja nahaproovidele teostati TÜ GI teaduri dr Toni de Dios Martíneze poolt.

2.2.9.1 Järjestuste ettevalmistamine ja referentsile joondamine

Sekveneerimisandmed salvestati serverisse **.fastq.gz* formaadis. Kasutades käsku *sinfo* veenduti, kas klastris on vabu üksikmasinaid. Järgmiseks loodi fail formaadis **.txt*, mis sisaldas **.fastq.gz* failide aadresse ja proovide ID-sid loodavate failide nimede tarvis. Järjestuste joondamiseks inimese referentsgenoomile kasutati kolmest etapist koosnevat TÜ GI vana DNA analüüsi bioinformaatilist töövoogu (koostatud dr Lauri Saagi ja dr Lehti Saagi poolt). Iga astme lõpptulemus oli sisendiks järgmisele etapile.

Esimeses etapis eemaldati adapterite järjestused mõlemast fragmendi otsast, milleks kasutati programmi *cutadapt* (Martin, 2011). Fragmentide otstest eemaldati ka aluspaarid, mille kvaliteediskoor oli väiksem kui 10 ning edasisest analüüsist jäeti välja fragmendid, mis olid lühemad kui 28 ap. Järgmiseks liideti saadud **_trimR1.fastq.gz* ja **_trimR2.fastq.gz* failid, mis sisaldasid sama fragmendi kummastki otsast sekveneerimisel saadud järjestusi, omavahel programmiga *flash* (Magoč ja Salzberg, 2011). Seejärel joondati saadud järjestused inimese referentsjärjestusele GRCh37 (*Genome Reference Consortium Human Build 37*, hs37d5), mis viidi läbi programmiga *bwa aln* (Li ja Durbin, 2009). Järgnevalt sorteeriti järjestused programmi *samtools* (Li et al., 2009) abil. Selle tegevuse lõpuks väljastati **.bam* vormingus fail, mis sisaldas ainult inimese genoomile joondunud järjestusi. Kuna sekveneerimine *Illumina NextSeq 500* platvormil toimub samaaegselt 4 paralleelsel rajal, siis väljastatakse iga proovi kohta 4 paari faile. Kõik paarid läbivad töövoogu esimese astme eraldi.

Teises etapis liideti esimeses astmes saadud neli faili ja eemaldati PCR-i käigus tekkinud duplikaadid programmi *picard* (Picard, 2023) abil. Järgmiseks joondati programmi *GATK* (McKenna et al., 2010) abil indelid lokaalselt uuesti. Seejärel filtreeriti välja järjestused, mille joondumiskvaliteedi skoor oli väiksem kui 10 (hinnang anti *bwa aln* programmi poolt (Li ja Durbin, 2009)), kasutades programmi *samtools* (Li et al., 2009; Li ja Durbin, 2009) abi.

Kolmandas etapis arvutati *samtools bamstats* käsuga lõplike järjestusfailide põhjal statistikud ning dr. Lauri Saagi poolt kirjutatud skripti abil arvutati nende ja erinevates etappides kaasatud järjestuste arvude põhjal koondstatistikud, mis kirjutati tabelifaili, mis sisaldas statistikuid kõigi koos joondatud proovide kohta. Tabelis oli välja toodud informatsioon täisgenoomi, eraldi X ja Y kromosoomi ning mitokondri genoomi kohta (keskmine genoomi katvus, fragmentide keskmine pikkus, järjestuste arv jne), endogeense DNA ja duplikaatide sisaldus ning efektiivsus (lõpliku ja algse järjestuste arvu suhe).

2.2.9.2 Järjestuste in silico kvaliteedikontroll

In silico kvaliteedikontrolli läbiviimiseks koostati *.txt vormingus fail, mis sisaldas *.bam joondusfailide aadresse ja proovide ID-sid loodavate failide nimede tarvis. Kvaliteedikontrolli alla kuuluvad järgmised osad: vana DNA kahjustuse määramine, soo määramine, meessoost indiviidide X-kromosoomi saastatuse määramine ja mtDNA saastatuse määramine.

Vana DNA kahjustuste määramiseks kasutati programmi *mapDamage* (Jónsson et al., 2013) ja tuvastati, kui palju oli toimunud nukleotiidseid asendusi (C>T) fragmentide otstes.

Järgmiseks määrati analüüsitavate indiviidide sugu skriptiga *sexing.py* (Skoglund et al., 2013), mis hindas, kui suur osa sugukromosoomidele joondunud järjestustest on joondunud Y-kromosoomile. Usaldusväärseks loeti genoomi keskmist katvust üle 0,005x.

X-kromosoomi saastatuse määramiseks meessoost indiviididel kasutati (Rasmussen et al., 2011) meetodit, mis on implementeeritud programmis *ANGSD* (Korneliussen et al., 2014). Usaldusväärseks loeti tulemused, kus X-kromosoomi katvus oli suurem kui 0,1x.

Meetodit *contamMix* (Fu et al., 2013) kasutati mtDNA saastatuse määramisel. Kõigepealt eraldati *.bam failist järjestused, mis olid joondunud mitokondri järjestusele ning loodi nende põhjal konsensusjärjestus. Edasi liideti see mtDNA konsensusjärjestuste võrdluspaneeliga (sisaldab 311 erinevat mtDNA järjestust) ning siis joondati algsed järjestused paneelile. MtDNA saastatus sõltub sellest, kui suur osa järjestustest sobitub paremini teistele võrdluspaneeli mtDNA genoomidele, kui uuritava proovi konsensusjärjestusele. Usaldusväärseks loetakse mtDNA katvust, mis jääb üle 5x.

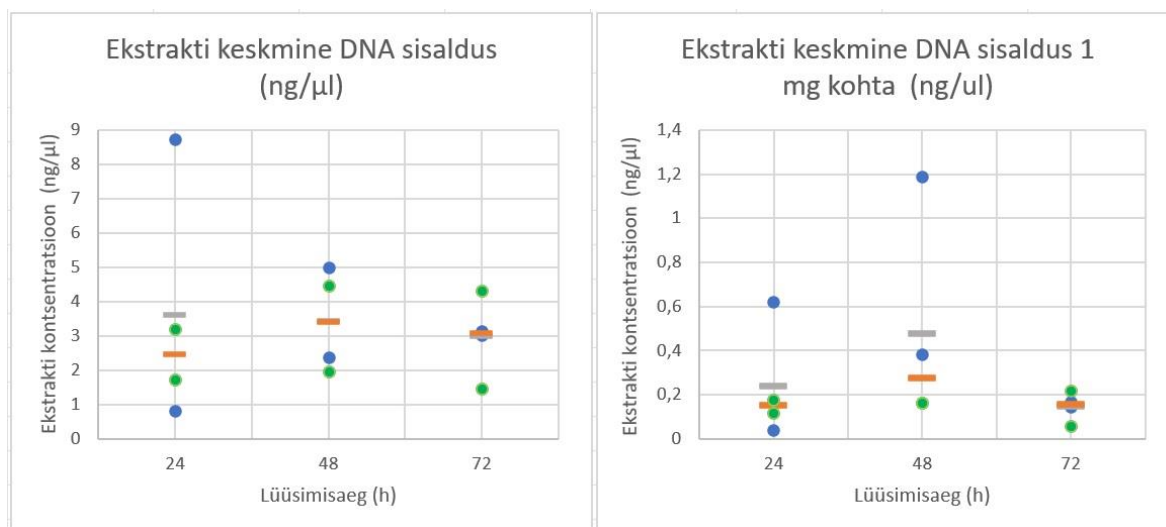
2.3 Tulemused ja arutelu

2.3.1 Uute materjalide ekstraheerimisprotokollide optimeerimise tulemused

Iga uue materjali korral, mis laborisse jõuab, on vaja kasutusele võtta uued ekstraheerimisprotokollid. Antud uurimistöö raames oli töös kolm uut bioarheoloogilist materjali TÜ GI vana DNA laboris – nahk, koproliit ja pinnas. Naha ja koproliidi protokollid vajasisid optimeerimist, kuid pinnase jaoks oli sobiv protokoll olemas.

2.3.1.1 Qiagen *Blood&Tissue* kit

Naha puhul kasutati antud uurimistöös Qiageni poolt toodetud reagentide komplekti. Kuna konkreetset naha DNA eraldamiseks vajalikku rakukestade lüüsimisaega komplektiga kaasas olnud käsiraamatus ei antud, siis optimeeriti katses lüüsimisaegu. Kasutati 3 erinevat ajapiiri – 24 tundi, 48 tundi ja 72 tundi. Saadud ekstraktide puhul mõõdeti Qubit 2.0 Fluoromeetriga DNA sisaldust ning ekstraktide DNA kontsentratsioone võrreldi nii absoluutväärtustena kui 1 mg sisendmaterjali kohta (joonis 21).



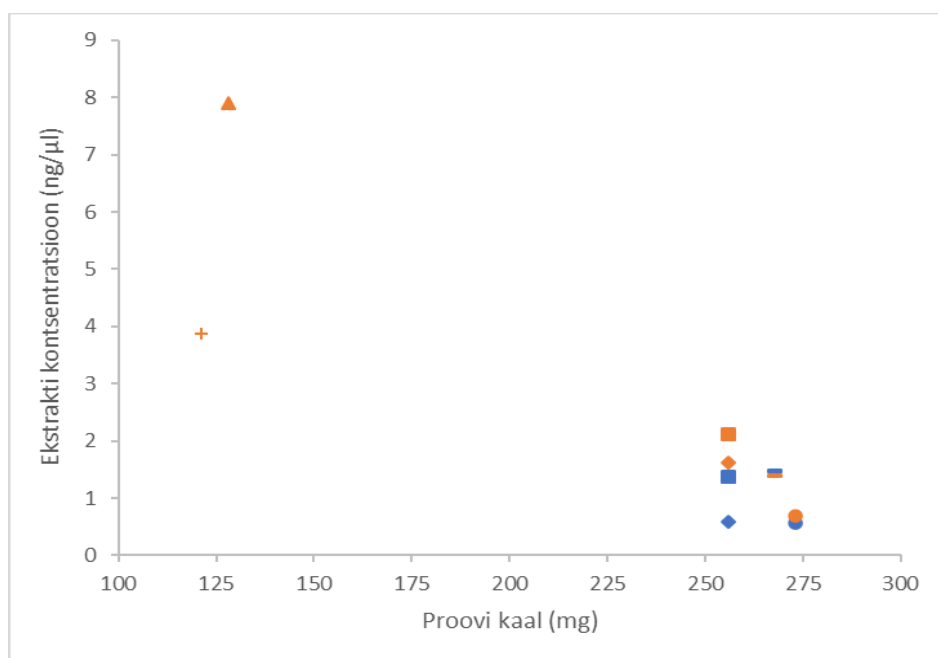
Joonis 21. Erinevate lüüsimisaegade võrdlus DNA eraldamisel nahaproovidest. A: Nahast eraldatud ekstrakti keskmine DNA sisaldus (ng/μl); B: Nahast eraldatud ekstrakti keskmine DNA sisaldus 1 mg sisendmaterjali kohta (ng/μl). Ekstraktide kontsentratsioonid (ng/μl): roheline: esimene naha fragment, sinine: teine naha fragment; hall: kontsentratsioonide keskmised lüüsimisaegade kaupa; oranž: kontsentratsioonide mediaanid lüüsimisaegade kaupa.

Kuna mitmel juhul on ühe proovi kontsentratsioon ülejäänutest erinev ning väärtuste jaotus eri lüüsimisaegadel on samuti erinev, võrreldi ekstraktide kontsentratsioone erinevatel lüüsimisaegadel Mann Whitney U testiga (<https://astatsa.com/WilcoxonTest/> (Mann ja Whitney, 1947)). Saadud tulemustes statistilisi erinevusi ei esine – p-väärtused ekstraktide keskmise

DNA sisalduse jaoks eri lüüsiaegadel on 0,686, 1,000 ja 0,686 ning ekstrakti keskmise DNA sisalduse 1 mg kohta jaoks eri lüüsiaegadel 0,486, 1,000 ja 0,343. Antud analüüsi tulemuste põhjal võib väita, et naha lüüsimiseks piisab 24 tunnist, kuid tulevikus võiks katset korrata suurema valimiga.

2.3.1.2 Qiagen *DNeasy PowerFeces Pro Kit*

Koproliidi puhul kasutati antud uurimistöös Qiageni poolt toodetud reagentide komplekti. Esimene katse viidi läbi protokollis antud proovi kaalutisega. Selgus, et kuna kasutatav materjal oli läbikuivanud, siis etteantud kaalutise maht on protokollis läbiviimiseks liiga suur. Seda seetõttu, et kuivanud materjal on võrreldes värskes väljaheitega kerge, nii et ettenähtud massiga proovi maht on suur, mistõttu lisatava puhvri kogusest jääb väheks, kuna enamus puhvrist imendub materjali sisse ja seda ei saa edasistes etappides kasutada. Seetõttu viidi läbi teine katse, kus kasutati juba eelnevalt proovistatud 4 proovi ja proovistati kaks uut proovi, mille jaoks võeti materjali 2 korda vähem, kui protokollis ette antud. Teises katses viidi protokollis sisse ka lisaetapp – enne proovi homogeniseerimist inkubeeriti proove 65 °C juures 10 minutit. Lisaks muudeti pisut homogeniseerimise režiimi – algne 30s homogeniseerimist, 30s pausi tsükli kordamine 10 minuti jooksul asendati paremini jälgitava kuuekordse tsükli kordamisega.

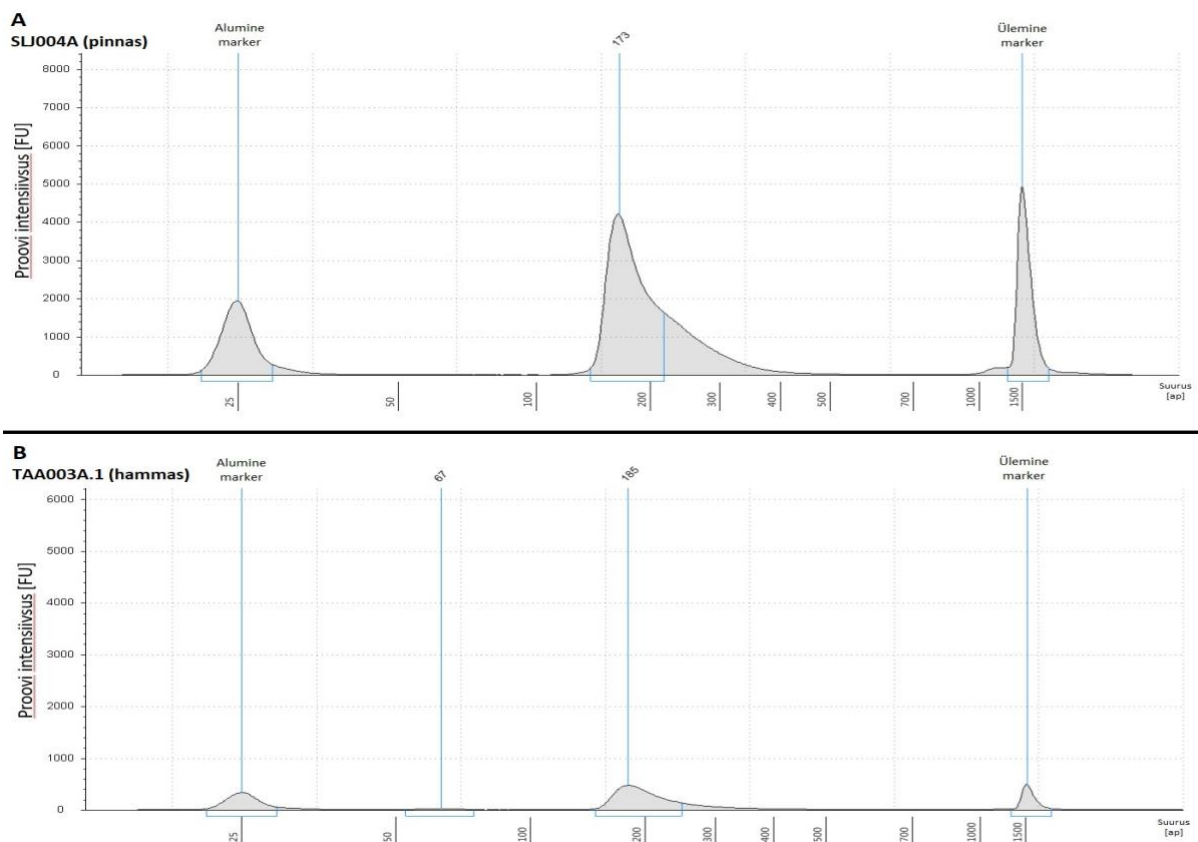


Joonis 22. Koproliidiproovide ekstraheerimise tulemused (Qiagen *DNeasy PowerSoil Pro Kit* abil): kontsentratsiooni (ng/μl) sõltuvus analüüsiks võetud proovi massist (mg) väga kuiva proovimaterjali korral. Sinine: esimene katse: neli proovi massiga ~250 mg; oranž: teine katse: esimese katse proovid uue lüüsipuhvriga ja kaks uut proovi massiga ~125 mg.

Jooniselt 22 võib näha, et homogeniseerimise režiimi muutmine ja inkubeerimisetapi lisamine esimese nelja proovi puhul suuri muutusi ei põhjustanud. Tulevikus võiks uurida, kas tulemused muutuvad, kui tsüklite arvu suurendada või vähendada. Seevastu proovi koguse vähendamine suurendas märkimisväärselt ekstrakti kontsentratsiooni, mis annab alust arvata, et kuivanud materjali korral on protokollis antud 250 mg mahuliselt liiga suur kogus ja lüüsi puhvrit ei jätku piisavalt. Samuti on suure mahu kasutamine problemaatiline edasiste sammude läbiviimisel, kuna puhverlahuse lisamisel imab proov vedeliku endasse ja supernatandi maht on $\frac{2}{3}$ võrra väiksem, kui protokollis antud oodatav kogus.

Pinnaseproovidele sobis kommertsiaalse komplektiga kaasa olnud käsiraamatu järgi koostatud protokoll. Ekstraheerimisprotokollide koostamisel selgus, et Qiagen *DNeasy PowerFeces Pro Kit* ja Qiagen *DNeasy PowerSoil Pro Kit* sisaldavad täpselt samu tarvikuid ja reagente ning ka tootja kodulehel väljatoodud dokumentatsioon oli kattuv.

2.3.2 Uuritavate proovide kvaliteet ja sekveneerimise tulemused



Joonis 23. Sekveneerimisraamatukogude pikkusjaotus (ap), mõõdetud *Agilent TapeStation Systems*-ga. A: pinnas, enim fragmente 173 ap; B: hammas, enim fragmente 185 ap.

Loodud sekveneerimisraamatukogude kontsentratsioonid olid erinevad, kuid kõigis raamatukogudes enim adapteritega DNA fragmente pikkusega 173–198 ap (joonis 23). Korraga sekveneeriti ühel NextSeq 500 150 ap kiibil koos 20 proovi ning ühe proovi kohta saadud keskmine järjestuste arv oli 18,5 miljonit.

2.3.2.1 Inimese järjestuste analüüs

Kuna bioarheoloogilistest proovidest saadud ekstrakt sisaldab rohkem kui ühe liigi DNA-d, siis nimetatakse uuritava liigi, kellelt proov pärineb, DNA-d endogeenseks DNA-ks (Poinar et al., 2006). Antud uurimistöös kasutatud 7 inimhamba endogeense DNA sisaldused jäid vahemikku 0,03–82,61% (mediaanväärtus 31,93%), neist 3 proovi (millest üks pärines samalt indiviidilt kui nahaproovid) endogeense DNA sisaldus jäi alla 10% (tabel 9). Nahaproovide endogeense DNA sisaldus oli vahemikus 0,01–0,12% (mediaanväärtus 0,04%). Hambakivi, koprolüüdi ja setete puhul on ootuspäraselt tegemist paljude erinevate liikide DNA-ga, kuid nende inimese DNA sisaldused olid vahemikus 0,01–0,57% (mediaanväärtus 0,06%) .

Analüüsides sekvenaatorist väljuvaid andmeid ja filtreerides sealt välja liiga lühikesed ning inimgenoomile mitte joondunud, madala joondumiskvaliteediga ja duplikaatsed järjestused ning võrreldes nende hulka algse järjestuste hulgaga, saame teada lõplike analüüsis kasutatavate fragmentide osakaalu, mida nimetatakse genoomse raamatukogu efektiivsuseks. urimistöös kasutatud hammaste puhul jäid efektiivsused vahemikku 0,02–61,93% (mediaanväärtus 22,56%) (tabel 9).

Sekveneeritud proovide keskmised ülegenoomsed katvused jäid vahemikku 0,00001–0,223x, hambaproovide puhul 0,00006–0,223x ja neist nelja puhul üle 0,02x (tabel 9), mis oleks kasutatav populatsioonigeneetilistes ülegenoomsetes analüüsides.

Kontrollimaks, kas sekveneeritud DNA näol on tegemist vana DNA, mitte tänapäevase saastusega, on vaja uurida surmajärgselt toimunud tsütosiini deamineerumist fragmentide 5' otstes (Briggs et al., 2007; Hofreiter et al., 2001), mis tingib tsütosiini muutumise uratsiiliks ning mis sekveneerimisandmestikus väljendub tsütosiini asendumisega tümiiniks (C>T). Kui need asendused on olemas, võib väita, et proov sisaldab vana DNA-d. Antud töös kasutatud hamba, koprolüüdi ja hambakivi proovide korral jäi C>T asenduste hulk 5,83–17,18% vahemikku (mediaanväärtus 11,47%) ja naha ning pinnase proovidel 1,00–10,00% vahemikku (mediaanväärtus 4,39%) .

Inimese DNA põhjal õnnestus sugu määrata vaid neljale indiviidile kuulunud hambaproovidest, kuna ülejäänud proovid ei sisaldanud piisavalt inimese DNA-d. Neist kolm olid mehed ja üks naine (tabel 9).

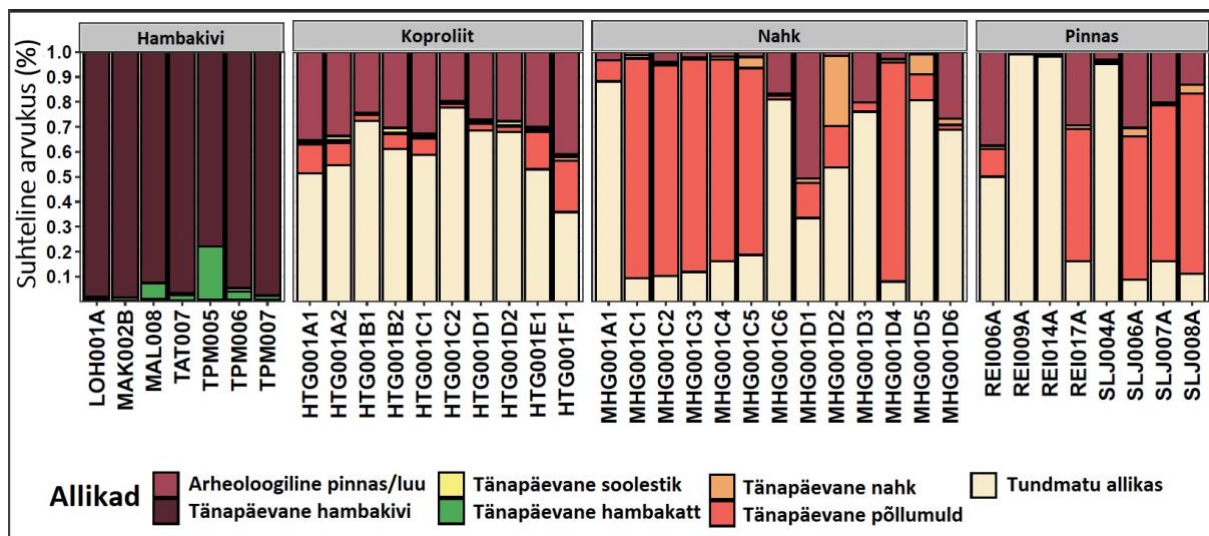
Lisaks uuriti ka proovide saastatust mtDNA ja meeste X kromosooni alusel. Antud töös õnnestus ka saastatuse tase määrata vaid hambaproovidel. Sealjuures mtDNA saastatus tase õnnestus määrata seitsmest neljal proovil ja nende tase jäi alla 3%. Meessoost indiviidi X kromosoomi saastatust määrati kõigil kolmel kindlalt meessoost indiviidil ning saastatuse tase jäi alla 2%.

Tabel 9. Hambaproovide sekveneerimise tulemused. Endogeenne DNA (%), efektiivsus (%), keskmine ülegenoomne katvus, geneetiline sugu, tsütosiini deamineerumine fragmentide 5' otstes (C>T), mtDNA saastatus, meeste X kromosoomi saastatus.

Laboratory ID	Endogeenne DNA	Efektiivsus	Keskmine ülegenoomne katvus	Geneetiline sugu	C>T	mtDNA saastatus	Meeste X kromosoomi saastatus
KOY001A SG1	0.31%	0.21%	0.0007240	kooskõlas XY-ga, kuid mitte XX-ga	13.00%	NA	NA
KOY002A SG1	66.94%	47.40%	0.1770000	XY	6.00%	0.26%	0.01%
MHG001A	0.06%	0.03%	0.0000918	kooskõlas XY-ga, kuid mitte XX-ga	11.60%	NA	NA
TAA002A SG1	0.03%	0.02%	0.0000593	kooskõlas XY-ga, kuid mitte XX-ga	9.00%	NA	NA
TAA003A SG1	31.93%	22.56%	0.0884000	XY	13.00%	0.64%	0.01%
TAA004A SG1	67.48%	37.79%	0.1240000	XY	13.73%	1.28%	1.39%
TAA005A SG1	82.61%	61.93%	0.2230000	XX	7.00%	0.10%	NA

2.3.2.2 Metagenoomsed analüüsid

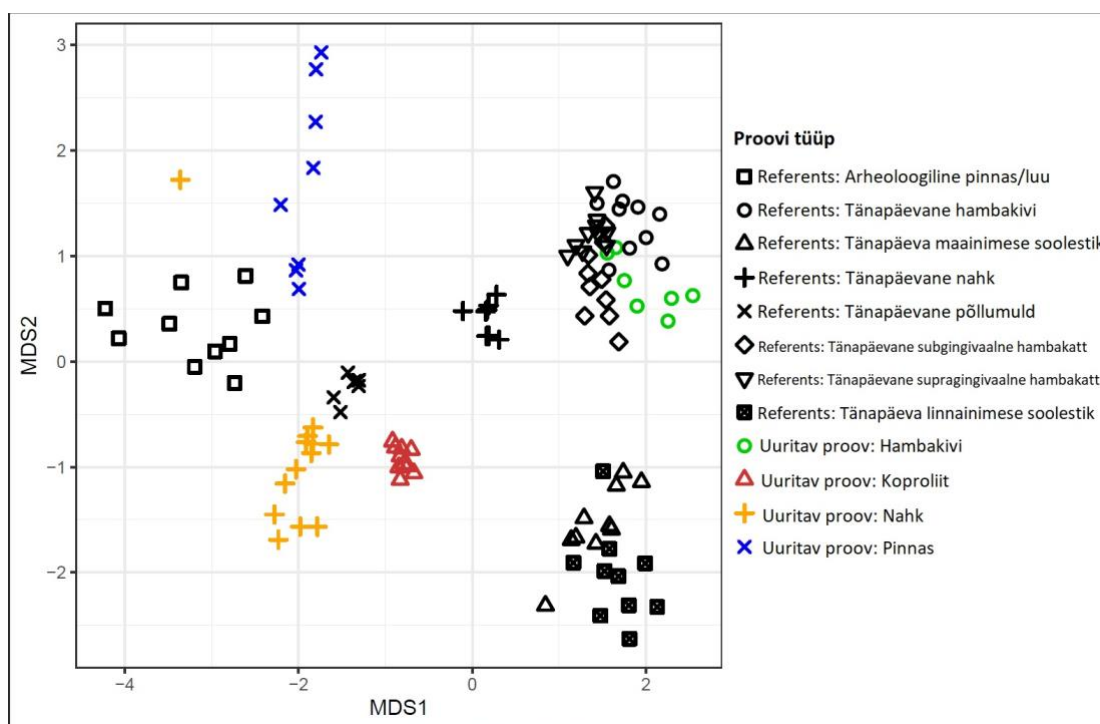
Metagenoomsete analüüsidega püüti kinnitada hambakivi, naha, pinnase ja koproliidi proovide vastavust antud materjalide mikroobsetele profiilidele. Need analüüsid viidi läbi dr Toni de Dios Martinezi poolt.



Joonis 24. Referentsmaterjalidele omaste mikroobiprofiilide osakaalud uuritavates proovides.

Hambakivi ja osade setteproovide metagenoomsete analüüside tulemused sarnanesid vastavate referentsproovidega (joonised 24 ja 25).

Metagenoomianalüüsi tulemustest (joonis 24 ja 25) on näha, et naha- ja koproliidiproovid sisaldasid peamiselt pinnasebakterite ja tuvastamata allikatest pärinevate prokarüootide järjestusi, mis ei vasta tüüpilistele naha või soole mikrofloora profiilidele. Koproliidist leiti lisaks ka paelussi mtDNA järjestusi, millega õnnestus antud proovi autentsust tõendada.



Joonis 25. Uuritavad ja referentsproovid multidimensionaalse skaleerimise (MDS) analüüsis. Värviliste kujunditega on märgitud uuritavad materjalid, mustade kujunditega referentsmaterjalid.

2.3.3 TÜ GI vana DNA labori Meyer & Kircher protokoll ja modifitseeritud BEST protokoll võrdlus

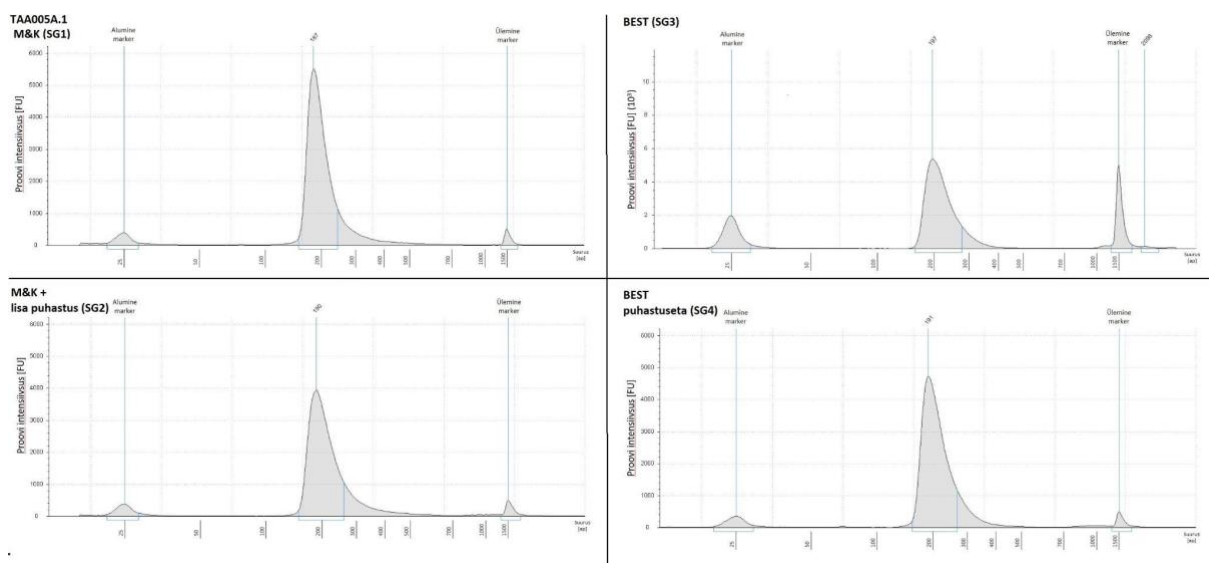
Raamatukogude protokollide võrdlus tehti hammastest valmistatud raamatukogude põhjal. Saadud raamatukogude kvaliteeti hinnati enne sekveneerimist raamatukogu DNA sisalduse (tabel 10) ja fragmentide pikkuste järgi (tabel 10, joonis 26).

Mõlemale raamatukoguprotokollile lisati teine versioon, kuna modifitseeritud BEST protokoll sisaldab enne fragmentide amplifitseerimist puhastusetappi, aga M&K mitte, ning oli vaja hinnata, kas see mõjutab tulemusi. Madala kontsentratsiooniga proovide puhul langes see modifitseeritud BEST protokoll puhastuseta versioonis veel (need proovid vajasisid reamplifitseerimist) ning M&K lisa puhastusega versioon tõstis osade raamatukogude kontsentratsiooni. Samuti nähtus esmasest kvaliteedikontrollist, et kõrgema DNA sisaldusega

ekstraktide korral töötas modifitseeritud BEST protokoll paremini, kui madalama DNA sisalduse korral (neis esines jätkuvalt praimereid ja dimeere).

Tabel 10. Nelja raamatukogu protokoll järgi loodud sekveneerimisraamatukogude DNA sisaldused (ng/μl) ja fragmentide pikkused. TÜ GI vana DNA labori tavaprotokoll; lisa puhastusega TÜ GI vana DNA labori tavaprotokoll; modifitseeritud BEST protokoll; modifitseeritud BEST ilma puhastuseta.

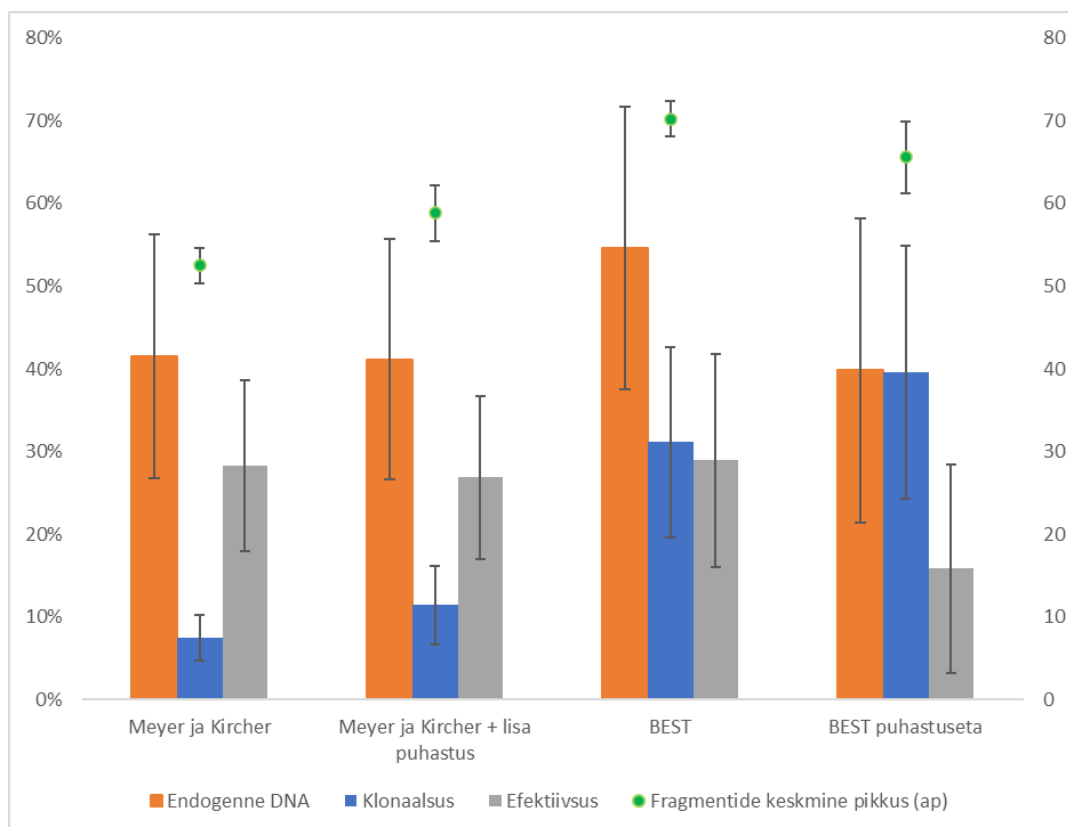
Proovi ID	Meyer&Kircher		Meyer&Kircher + lisa puhastus		BEST		BEST puhastuseta	
	SG1		SG2		SG3		SG4	
	Qubit HS 1+199 (ng/μL)	Average fragment length (bp)	Qubit HS 1+199 (ng/μL)	Average fragment length (bp)	Qubit HS 1+199 (ng/μL)	Average fragment length (bp)	Qubit HS 1+199 (ng/μL)	Average fragment length (bp)
TAA002A	16,550	179	53,800	176	6,760	183	6,820	182
TAA003A	0,746	185	4,810	183	1,001	192	11,700	186
TAA004A	4,560	180	10,540	185	0,679	191	8,700	203
TAA005A	7,270	187	7,450	190	27,300	197	9,120	191
KOY001A	14,550	184	16,500	192	9,990	186	4,160	143
KOY002A	1,985	183	1,615	189	3,720	205	14,900	183



Joonis 26. Nelja raamatukogu protokoll pikkusjaotus (ap), mõõdetud Agilent TapeStation Systems-ga. M&K: TÜ GI vana DNA labori tavaprotokoll; M&K + lisa puhastus: lisa puhastusega TÜ GI vana DNA labori tavaprotokoll; BEST: modifitseeritud BEST protokoll; BEST puhastuseta: modifitseeritud BEST ilma puhastuseta.

Saadud tulemustest on näha (joonis 27), et M&K ja modifitseeritud BEST protokoll kokku nelja versiooni vahel puudub statistiline erinevus endogeense DNA sisalduses ja efektiivsuses, ent BEST-is esineb rohkem duplikaate, mis lisasekveneerimisel vähendavad efektiivsust ning piiravad potentsiaalset võimalust tõsta katvust.

Vähelagunenud DNA korral annab modifitseeritud BEST keskmiselt pikemad fragmendid (Carøe et al., 2018), mida on ka antud uurimistöö tulemustest näha. M&K protokolliga saadud fragmendi pikkused jäävad keskmiselt 50–60 ap vahele ja modifitseeritud BEST protokolliga saadud fragmendid keskmiselt vahemikku 60–70 ap (joonis 27).



Joonis 27. Raamatukogu protokollide võrdlus: Meyer & Kircher, Meyer & Kircher + lisapuhastus, modifikatsioonidega BEST ja Modifikatsioonidega BEST puhastuseta. Oranž: endogeenne DNA (%) – inimese DNA osakaal proovis, sinine: klonaalsus (%) – PCR-i duplikaatide osakaal inimese DNA järjestustes, hall: efektiivsus (%) – analüüsides kasutamiseks sobilike DNA järjestuste osakaal toorandmetes, roheline: DNA fragmentide keskmine pikkus (ap).

Lisaks hinnati mõlema raamatukogu ajakulu ning proovi kohta kuluvate materjalide hinda. Modifitseeritud BEST protokollide reagentide hind kolmes esimese etapis on madalam, kui M&K protokollis aga fragmentide amplifitseerimiseks kasutatav ensüüm on ~5x kallim, mis vähendab hinnavahet kahe raamatukogu vahel. Ajakulu oli pisut raske hinnata, kuna kõik raamatukogu protokollid viidi läbi samaaegselt ning ühe inimese poolt. Inkubeerimise aeg kokku on modifitseeritud BEST protokollil pikem (2,5 h, M&K-l ~1,5 h), aga M&K protokollis on kaks puhastusetappi ning fragmentide amplifitseerimise segu jagatakse kaheks, mis lisab M&K protokollile lisa ajakulu. Samas modifitseeritud BEST protokollis juures on oluline adapterite ja DNA suhe, mistõttu lisandub ekstraktide DNA sisalduse mõõtmisele ja adapterisegu lahjenduste tegemisele kuluv aeg, mis vähendab ajalist eelist M&K ees.

Kokkuvõte

Käesoleva töö eesmärgiks oli testida kommertsiaalseid ning eelkõige kaasaegsete bioloogiliste materjalide käsitsemiseks mõeldud DNA eraldamise protokolle erinevatest bioarheoloogilistest materjalidest eraldatud proovidel, võrrelda erinevate genoomsete raamatukogude valmistamise meetodikate sobivust nendest materjalidest eraldatud DNA sekveneerimiseks ning nende mõju vana DNA sekveneerimistulemustele. Selleks eraldati DNA 44 proovist, sealhulgas 6 proovi monoliitsest keskaegsest koproliiditükist ja 12 proovi kahest keskaegselt individilt pärinevast nahafragmendist, milleks kasutati sobivaid ekstraheerimisprotokolle vastavalt materjali eripäradele.

DNA ekstraheerimisprotokolli optimeerimine viidi läbi uute materjalide – koproliidi ja naha – puhul. Koproliidil testiti erinevaid proovi algkoguseid – võrreldi käsiraamatus antud kogust 2 korda vähendatud kogusega. Testi tulemused kinnitasid, et läbikuivanud ja väga kerge keskaegse koproliidiproovi puhul tuleb protokolli modifitseerida. Protokolli lisati juhised, et kui uuritav materjal ei sisalda vett või sisaldab seda väga väikeses koguses, tuleb uuritava materjali kogust vähendada nii, et lüüsi puhvrit oleks piisavalt. Optimaalne kogus sõltub konkreetsest materjalist ning tuleb iga materjalitüübi korral uuesti määrata.

Nahaproovist DNA eraldamiseks katsetati kolme erinevat lüüsimisaega: 24, 48 ja 72 tundi. Erinevatel lüüsimisaegadel saadud ekstraktide kontsentratsioonid ei olnud statistiliselt oluliselt erinevad, mistõttu võib saadud tulemustele tuginedes väita, et lüüsimisaja pikendamine nahast DNA eraldamisel saagist ei tõsta. Siinkohal tõstatisid uued küsimused seoses materjali kvaliteediga, kuna nii kõigi nahaproovide kui ka samalt individilt eraldatud hambaproovi endogeense DNA sisaldus olid väga madalad. Parema ülevaate saamiseks tuleks katset korrata suurema valimiga.

Genoomsete raamatukogude protokollide võrdluses kasutati TÜ GI vana DNA labori tavaprotokolli, mis sisaldab ekstrakti mitme-etapilist puhastamist DNA-d siduvate kolonnidega ja modifikatsioonidega BEST ehk nn ühe tuubi protokoll. Testmaterjalina olid kasutusel keskajal elanud individide hammastest eraldatud DNA ekstraktid. Võrdluses kasutati 6 proovi, millest neljal oli endogeense DNA sisaldus üle 10%. Modifikatsioonidega BEST protokollil alusel saadud tulemustes võrreldes TÜ GI vana DNA labori tavaprotokolliga endogeense DNA sisaldustes statistilist erinevust ei esine, kuid BEST protokollil alusel koostatud genoomsed raamatukogud sisaldasid rohkem duplikaate kui TÜ GI vana DNA labori tavaprotokoll. Samuti olid modifikatsioonidega BEST protokollist saadud DNA fragmentide

keskmised pikkused pisut pikemad, jäädes vahemikku 60–70 ap, samal ajal kui TÜ GI vana DNA labori tavaprotokolli järgi saadud fragmentide keskmised pikkused jäid vahemikku 50–60 ap. Saadud tulemusi hinnates võib öelda, et TÜ GI vana DNA labori tavaprotokolli ja modifikatsioonidega BEST protokolli tulemused on väga sarnased ning kuigi modifikatsioonidega BEST protokolli alusel koostatud genoomsed raamatukogud sisaldavad pisut pikemaid DNA fragmente, st rohkem infot, on selle protokolliga loodud raamatukogudes rohkem duplikaate, mis raskendavad ülegenoomse katvuse tõstmist. Seetõttu ei ole hetkel kasutatava TÜ GI vana DNA labori genoomsete raamatukogude valmistamise tavaprotokolli asendamine ilma edasiste uuringuteta aega ja kulusid optimeerivate meetodite osas otstarbekas.

Töö viidi läbi projekti PRG1027 “Keskaegse populatsiooni struktuur, tervis ja haigused Eesti territooriumil vana DNA vaatenurgast” raames.

Analysis of DNA isolation and genomic library preparation methodologies based on various bioarchaeological materials

Helja Niinemäe

Summary

Archaeogenomics is a relatively new and rapidly developing field, where new information is found on a daily basis about past events, species that have once lived, and also about the spread of diseases. New data are obtained by using new bioarchaeological materials, for which it is necessary to find optimal and less destructive methods for DNA extraction and for pre-sequencing processing of the extracts.

A number of commercial reagent kits have been developed for DNA extraction, most of which have been designed for modern samples. In order to use them on ancient materials, they have to be tested and, if necessary, modified and optimized before being put into use, because ancient DNA is considerably different from DNA isolated from living organisms. There is also a need for better sequencing library preparation methods that utilize all DNA extracted from a sample, regardless of its quality and form.

The aim of this work was to test DNA extraction protocols on samples isolated from different bioarchaeological materials, to compare the suitability of genomic library preparation methods for these materials and their effect on the sequencing results. For this, DNA was extracted from 44 samples, including 6 samples from a monolithic medieval coprolite and 12 samples from skin fragments from two medieval individuals, using appropriate extraction protocols according to the specificities of the material. Different sample amounts were tested for the coprolite – the amount given in the manual was compared with a twice smaller amount. The results showed that if the test material is very dry and does not contain water or contains only a very small amount of it, the amount of test material must be reduced so that there is enough lysis buffer. The optimal sample amount depends on the material and must be determined for each type of material.

Three different lysis times were tested for DNA extraction from the skin sample: 24, 48 and 72 hours. The concentrations of the extracts obtained at different lysis times were not statistically significantly different, therefore, based on the result obtained in this work, it can be stated that increasing the lysis time does not increase the yield when extracting DNA from the skin. However, the endogenous DNA content of both the skin samples and the tooth sample isolated from the same individual was very low. To get a better insight, the experiment should be repeated with a larger sample size.

The protocol provided in the manual included with the commercial kit was suitable for the soil samples. When going through it, it turned out that the consumables and reagents included in this kit overlap one-to-one with the contents of the coprolite kit, as does the documentation on the manufacturer's website.

In the comparison of genomic library building protocols, the standard protocol of the ancient DNA laboratory of the University of Tartu (UT) Institute of Genomics (IG) was used, which includes several purification steps, as well as a modified BEST, or so-called one-tube, protocol. DNA extracts isolated from the teeth of individuals who lived in the Middle Ages were used as test material. Six samples were used in the comparison, four of which had an endogenous DNA content of more than 10%. There is no statistical difference in the content of endogenous DNA in the results of the modified BEST protocol compared to the standard protocol of the ancient DNA laboratory of UT IG, but the genomic libraries prepared based on the BEST protocol contained more duplicates than the standard protocol of the ancient DNA laboratory of UT IG. Also, the average lengths of the fragments obtained from the modified BEST protocol were slightly longer, ranging from 60 to 70 bp, while the average lengths of the fragments obtained from the standard protocol of the ancient DNA laboratory of UT IG were between 50 and 60 bp.

Evaluating the obtained results, it can be said that the results of the standard protocol of the ancient DNA laboratory of UT IG and the modified BEST protocol are very similar, and although the genomic libraries prepared on the basis of the modified BEST protocol contain slightly longer DNA fragments, i.e. more information, the libraries created with this protocol have more duplicates, which complicates increasing the genome-wide coverage. Therefore, it is not practical to replace the current standard protocol for the preparation of genomic libraries in the ancient DNA laboratory of UT IG without further research in terms of methods that optimize time and costs.

The work was carried out within the project PRG1027 "Medieval population structure, health and diseases in the territory of Estonia from the perspective of ancient DNA".

Tänuõnad

Minu suur tänu kuulub mu juhendajatele Kristiina Tambetsile ja Lehti Saagile. Tänu Kristiinale sain oma uuringus kasutada palju erinevaid põnevaid materjale ning hindamatu väärtusega oli temapoolne toetus hetkedel, mil ise oma oskustes kahtlema hakkasin. Nõu ja jõuga olid abiks ka Toni De Dios Martinez, Jüri Parik, Tuuli Reisberg, Anu Solnik ja Kadri Irdt – aitäh teile! Samuti tahan tänada Heiki Valku, Aivar Kriiskat, Mari Tõrva, Alar Rosentaud ja Tiit Hangi ehk kõiki, kellelt kõik need huvitavad proovid pärinevad. Ja Lehti, suurimad tänud sulle, et sa minuga öösiti koos kirjutasid - vaevalt olin peatüki lõpetanud, kui sa seda juba parandasid ja soovitusi lisasid.

Aitäh kõigile, kes te olite minuga sellel põneval, kohati keerulisel ning mõneti ka raskel teel!

Kirjanduse loetelu.

Adams, J. (2008). *Complex Genomes: Shotgun Sequencing*.

<https://www.nature.com/scitable/topicpage/complex-genomes-shotgun-sequencing-609/>

Adema, C. M. (2021). Sticky problems: extraction of nucleic acids from molluscs.

Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences, 376(1825), 20200162.

Adler, C. J., Dobney, K., Weyrich, L. S., ... Cooper, A. (2013). Sequencing ancient calcified dental plaque shows changes in oral microbiota with dietary shifts of the Neolithic and Industrial revolutions. *Nature Genetics*, 45(4), 450–455, 455e1.

Allentoft, M. E., Collins, M., Harker, D., ... Bunce, M. (2012). The half-life of DNA in bone: measuring decay kinetics in 158 dated fossils. *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society*, 279(1748), 4724–4733.

Alpaslan-Roodenberg, S., Anthony, D., Babiker, H., ... Zahir, M. (2021). Ethics of DNA research on human remains: five globally applicable guidelines. *Nature*, 599(7883), 41–46.

Alsos, I. G., Ehrich, D., Seidenkrantz, M.-S., Bennike, O., Kirchhefer, A. J., ja Geirsdottir, A. (2016). The role of sea ice for vascular plant dispersal in the Arctic. *Biology Letters*, 12(9). <https://doi.org/10.1098/rsbl.2016.0264>

AMPure XP, PCR Purification Reagent – Beckman Coulter. (2023, mai 17).

<https://www.beckman.com/reagents/genomic/cleanup-and-size-selection/pcr>

Armbrecht, L. H., Coolen, M. J. L., Lejzerowicz, F., ... Weyrich, L. S. (2019). Ancient DNA from marine sediments: Precautions and considerations for seafloor coring, sample handling and data generation. *Earth-Science Reviews*, 196, 102887.

Ávila-Arcos, M. C., de la Fuente Castro, C., Nieves-Colón, M. A., ja Raghavan, M. (2022).

Recommendations for Sustainable Ancient DNA Research in the Global South: Voices

- From a New Generation of Paleogenomicists. *Frontiers in Genetics*, 13, 880170.
- Bardill, J., Bader, A. C., Garrison, N. A., Bolnick, D. A., Raff, J. A., Walker, A., Malhi, R. S., ja Summer internship for INdigenous peoples in Genomics (SING) Consortium. (2018). Advancing the ethics of paleogenomics. *Science*, 360(6387), 384–385.
- Barlow, A., Cahill, J. A., Hartmann, S., ... Hofreiter, M. (2018). Partial genomic survival of cave bears in living brown bears. *Nature Ecology & Evolution*, 2(10), 1563–1570.
- Bentley, D. R., Balasubramanian, S., Swerdlow, H. P., ... Smith, A. J. (2008). Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature*, 456(7218), 53–59.
- Boessenkool, S., Hanghøj, K., Nistelberger, H. M., Der Sarkissian, C., Gondek, A. T., Orlando, L., Barrett, J. H., ja Star, B. (2017). Combining bleach and mild predigestion improves ancient DNA recovery from bones. *Molecular Ecology Resources*, 17(4), 742–751.
- Bos, K. I., Schuenemann, V. J., Golding, G. B., ... Krause, J. (2011). A draft genome of *Yersinia pestis* from victims of the Black Death. *Nature*, 478(7370), 506–510.
- Briggs, A. W., Stenzel, U., Johnson, P. L. F., ... Pääbo, S. (2007). Patterns of damage in genomic DNA sequences from a Neandertal. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(37), 14616–14621.
- Byrne, H. M., Niedźwiedzki, G., Blom, H., Kear, B. P., ja Ahlberg, P. E. (2022). Coprolite diversity reveals a cryptic ecosystem in an early Tournaisian lake in East Greenland: Implications for ecosystem recovery after the end-Devonian extinction. *Palaeogeography, palaeoclimatology, palaeoecology*, 605, 111215.
- Cameron, M. E. (2021). Working with and for Ancestors: Collaboration in the Care and Study of Ancestral Remains. Edited by Chelsea H. Meloche, Laure Spake, and Katherine L *American journal of physical anthropology*.
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ajpa.24383>

- Carøe, C., Gopalakrishnan, S., Vinner, L., Mak, S. S. T., Sinding, M. H. S., Samaniego, J. A., Wales, N., Sicheritz-Pontén, T., ja Gilbert, M. T. P. (2017). Single-tube library preparation for degraded DNA. *Methods in ecology and evolution / British Ecological Society*, 9(2), 410–419.
- Carøe, C., Gopalakrishnan, S., Vinner, L., Mak, S. S. T., Sinding, M. H. S., Samaniego, J. A., Wales, N., Sicheritz-Pontén, T., ja Gilbert, M. T. P. (2018). Single-tube library preparation for degraded DNA. *Methods in Ecology and Evolution / British Ecological Society*, 9(2), 410–419.
- Chakraborty, S., Saha, A., ja Neelavar Ananthram, A. (2020). Comparison of DNA extraction methods for non-marine molluscs: is modified CTAB DNA extraction method more efficient than DNA extraction kits? *3 Biotech*, 10(2), 69.
- Chapman, J. A., Mascher, M., Buluç, A., ... Rokhsar, D. S. (2015). A whole-genome shotgun approach for assembling and anchoring the hexaploid bread wheat genome. *Genome Biology*, 16(1), 26.
- Crump, S. E., Miller, G. H., Power, M., Sepúlveda, J., Dildar, N., Coghlan, M., ja Bunce, M. (2019). Arctic shrub colonization lagged peak postglacial warmth: Molecular evidence in lake sediment from Arctic Canada. *Global Change Biology*, 25(12), 4244–4256.
- Dabney, J., Knapp, M., Glocke, I., ... Meyer, M. (2013). Complete mitochondrial genome sequence of a Middle Pleistocene cave bear reconstructed from ultrashort DNA fragments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(39), 15758–15763.
- Damgaard, P. B., Margaryan, A., Schroeder, H., Orlando, L., Willerslev, E., ja Allentoft, M. E. (2015). Improving access to endogenous DNA in ancient bones and teeth. *Scientific Reports*, 5, 11184.
- Der Sarkissian, C., Pichereau, V., Dupont, C., ... Orlando, L. (2017). Ancient DNA analysis

- identifies marine mollusc shells as new metagenomic archives of the past. *Molecular Ecology Resources*, 17(5), 835–853.
- Fortes, G. G., Grandal-d'Anglade, A., Kolbe, B., ... Barlow, A. (2016). Ancient DNA reveals differences in behaviour and sociality between brown bears and extinct cave bears. *Molecular Ecology*, 25(19), 4907–4918.
- Fulton, T. L., ja Shapiro, B. (2019). Setting Up an Ancient DNA Laboratory. B. Shapiro, A. Barlow, P. D. Heintzman, M. Hofreiter, J. L. A. Paijmans, & A. E. R. Soares (Toim), *Ancient DNA: Methods and Protocols* (lk 1–13). Springer New York.
- Fu, Y., Foden, J. A., Khayter, C., Maeder, M. L., Reyon, D., Joung, J. K., ja Sander, J. D. (2013). High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nature Biotechnology*, 31(9), 822–826.
- Gamba, C., Hanghøj, K., Gaunitz, C., Alfarhan, A. H., Alquraishi, S. A., Al-Rasheid, K. A. S., Bradley, D. G., ja Orlando, L. (2016). Comparing the performance of three ancient DNA extraction methods for high-throughput sequencing. *Molecular Ecology Resources*, 16(2), 459–469.
- Gamba, C., Jones, E. R., Teasdale, M. D., ... Pinhasi, R. (2014). Genome flux and stasis in a five millennium transect of European prehistory. *Nature Communications*, 5, 5257.
- Gansauge, M.-T., Aximu-Petri, A., Nagel, S., ja Meyer, M. (2020). Manual and automated preparation of single-stranded DNA libraries for the sequencing of DNA from ancient biological remains and other sources of highly degraded DNA. *Nature Protocols*, 15(8), 2279–2300.
- Gansauge, M.-T., Gerber, T., Glocke, I., Korlevic, P., Lippik, L., Nagel, S., Riehl, L. M., Schmidt, A., ja Meyer, M. (2017). Single-stranded DNA library preparation from highly degraded DNA using T4 DNA ligase. *Nucleic Acids Research*, 45(10), e79.
- Gansauge, M.-T., ja Meyer, M. (2013). Single-stranded DNA library preparation for the

- sequencing of ancient or damaged DNA. *Nature Protocols*, 8(4), 737–748.
- Gansauge, M.-T., ja Meyer, M. (2014). Selective enrichment of damaged DNA molecules for ancient genome sequencing. *Genome Research*, 24(9), 1543–1549.
- Gilbert, M. T. P., Menez, L., Janaway, R. C., Tobin, D. J., Cooper, A., ja Wilson, A. S. (2006). Resistance of degraded hair shafts to contaminant DNA. *Forensic Science International*, 156(2-3), 208–212.
- Goldstein, P. Z., ja Desalle, R. (2003). Calibrating phylogenetic species formation in a threatened insect using DNA from historical specimens. *Molecular Ecology*, 12(7), 1993–1998.
- Gretzinger, J., Molak, M., Reiter, E., ... Schuenemann, V. J. (2019). Large-scale mitogenomic analysis of the phylogeography of the Late Pleistocene cave bear. *Scientific Reports*, 9(1), 10700.
- Hagelberg, E., Sykes, B., ja Hedges, R. (1989). Ancient bone DNA amplified. *Nature*, 342(6249), 485.
- Harkins, K. M., Schaefer, N. K., Troll, C. J., Rao, V., Kapp, J., Naughton, C., Shapiro, B., ja Green, R. E. (2020). A novel NGS library preparation method to characterize native termini of fragmented DNA. *Nucleic Acids Research*, 48(8), e47.
- Harney, É., Cheronet, O., Fernandes, D. M., ... Pinhasi, R. (2020). A Minimally Destructive Protocol for DNA Extraction from Ancient Teeth. *bioRxiv* (lk 2020.08.19.256412). <https://doi.org/10.1101/2020.08.19.256412>
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., ja deWaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society*, 270(1512), 313–321.
- Higuchi, R., Bowman, B., Freiburger, M., Ryder, O. A., ja Wilson, A. C. (1984). DNA sequences from the quagga, an extinct member of the horse family. *Nature*, 312(5991), 282–284.

- Hofreiter, M., Jaenicke, V., Serre, D., von Haeseler, A., ja Pääbo, S. (2001). DNA sequences from multiple amplifications reveal artifacts induced by cytosine deamination in ancient DNA. *Nucleic Acids Research*, 29(23), 4793–4799.
- Hofreiter, M., Mead, J. I., Martin, P., ja Poinar, H. N. (2003). Molecular cloning. *Current Biology: CB*, 13(18), R693–R695.
- Höss, M., ja Pääbo, S. (1993). DNA extraction from Pleistocene bones by a silica-based purification method. *Nucleic Acids Research*, 21(16), 3913–3914.
- <https://www.putty.org/>. (s.a.). Salvestatud 18. mai 2023, <https://www.putty.org/> (Original work published 2023)
- Jaenicke-Després, V., Buckler, E. S., Smith, B. D., Gilbert, M. T. P., Cooper, A., Doebley, J., ja Pääbo, S. (2003). Early allelic selection in maize as revealed by ancient DNA. *Science*, 302(5648), 1206–1208.
- Jensen, T. Z. T., Niemann, J., Iversen, K. H., ... Schroeder, H. (2019). A 5700 year-old human genome and oral microbiome from chewed birch pitch. *Nature Communications*, 10(1), 5520.
- Jónsson, H., Ginolhac, A., Schubert, M., Johnson, P. L. F., ja Orlando, L. (2013). mapDamage2.0: fast approximate Bayesian estimates of ancient DNA damage parameters. *Bioinformatics*, 29(13), 1682–1684.
- Kapp, J. D., Green, R. E., ja Shapiro, B. (2021). A Fast and Efficient Single-stranded Genomic Library Preparation Method Optimized for Ancient DNA. *The Journal of Heredity*, 112(3), 241–249.
- Kashuba, N., Kirdök, E., Damlien, H., Manninen, M. A., Nordqvist, B., Persson, P., ja Götherström, A. (2019). Ancient DNA from mastics solidifies connection between material culture and genetics of mesolithic hunter-gatherers in Scandinavia. *Communications Biology*, 2, 185.

- Keller, M., ja Scheib, C. L. (2023a). *Ancient DNA extraction (chunk samples/high volume)*.
https://www.protocols.io/view/ancient-dna-extraction-chunk-samples-high-volume-n92ldzbpvx5b/v1?version_warning=no
- Keller, M., ja Scheib, C. L. (2023b). *Decontamination of tooth roots/petrous bone cores for ancient DNA extraction*. <https://www.protocols.io/view/decontamination-of-tooth-roots-petrous-bone-cores-eq2lryp4qvx9/v1>
- Keller, M., ja Scheib, C. L. (2023c). *Sampling of tooth roots for ancient DNA*.
<https://www.protocols.io/view/sampling-of-tooth-roots-for-ancient-dna-6qpvrdr83gmk/v1>
- Keller, M., ja Scheib, C. L. (2023d). *Ancient DNA extract purification (chunk samples/high volume)*. <https://www.protocols.io/view/ancient-dna-extract-purification-chunk-samples-hig-j8nlkwje6l5r/v1>
- Keller, M., Scheib, C. L., ja Bonucci, B. (2023). *Library preparation (dsDNA double indexing, non-UDG, 2x split)*. <https://www.protocols.io/view/library-preparation-dsdna-double-indexing-non-udg-n2bvj6xqxlk5/v1>
- Key, F. M., Posth, C., Esquivel-Gomez, L. R., ... Krause, J. (2020). Emergence of human-adapted *Salmonella enterica* is linked to the Neolithization process. *Nature Ecology & Evolution*, 4(3), 324–333.
- Kircher, M., Sawyer, S., ja Meyer, M. (2012). Double indexing overcomes inaccuracies in multiplex sequencing on the Illumina platform. *Nucleic Acids Research*, 40(1), e3.
- Kjær, K. H., Winther Pedersen, M., De Sanctis, B., ... Willerslev, E. (2022). A 2-million-year-old ecosystem in Greenland uncovered by environmental DNA. *Nature*, 612(7939), 283–291.
- Korlević, P., Gerber, T., Gansauge, M.-T., Hajdinjak, M., Nagel, S., Aximu-Petri, A., ja Meyer, M. (2015). Reducing microbial and human contamination in DNA extractions from

- ancient bones and teeth. *BioTechniques*, 59(2), 87–93.
- Korneliussen, T. S., Albrechtsen, A., ja Nielsen, R. (2014). ANGSD: Analysis of Next Generation Sequencing Data. *BMC Bioinformatics*, 15(1), 356.
- Krause, J., Fu, Q., Good, J. M., Viola, B., Shunkov, M. V., Derevianko, A. P., ja Pääbo, S. (2010). The complete mitochondrial DNA genome of an unknown hominin from southern Siberia. *Nature*, 464(7290), 894–897.
- Lendvay, B., Hartmann, M., Brodbeck, S., Nievergelt, D., Reinig, F., Zoller, S., Parducci, L., Gugerli, F., Büntgen, U., ja Sperisen, C. (2018). Improved recovery of ancient DNA from subfossil wood - application to the world's oldest Late Glacial pine forest. *The New Phytologist*, 217(4), 1737–1748.
- Li, H., ja Durbin, R. (2009). Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*, 25(14), 1754–1760.
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., Durbin, R., ja 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. (2009). The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*, 25(16), 2078–2079.
- Lorenzen, E. D., Nogués-Bravo, D., Orlando, L., ... Willerslev, E. (2011). Species-specific responses of Late Quaternary megafauna to climate and humans. *Nature*, 479(7373), 359–364.
- Magoč, T., ja Salzberg, S. L. (2011). FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics*, 27(21), 2957–2963.
- Mak, S. S. T., Gopalakrishnan, S., Carøe, C., ... Gilbert, M. T. P. (2017). Comparative performance of the BGISEQ-500 vs Illumina HiSeq2500 sequencing platforms for palaeogenomic sequencing. *GigaScience*, 6(8), 1–13.
- Mann, H. B., ja Whitney, D. R. (1947). On a Test of Whether one of Two Random Variables is Stochastically Larger than the Other. *The Annals of Mathematical Statistics*, 18(1), 50–

- Margaryan, A., Hansen, H. B., Rasmussen, S., ... Allentoft, M. E. (2018). Ancient pathogen DNA in human teeth and petrous bones. *Ecology and Evolution*, 8(6), 3534–3542.
- Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal*, 17(1), 10–12.
- Massonneau, J., Ouellet, C., Lucien, F., Dubois, C. M., Tyler, J., ja Boissonneault, G. (2018). Suboptimal extracellular pH values alter DNA damage response to induced double-strand breaks. *FEBS Open Bio*, 8(3), 416–425.
- McKenna, A., Hanna, M., Banks, E., ... DePristo, M. A. (2010). The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Research*, 20(9), 1297–1303.
- Metzker, M. L. (2010). Sequencing technologies - the next generation. *Nature Reviews. Genetics*, 11(1), 31–46.
- Meyer, M., ja Kircher, M. (2010). Illumina sequencing library preparation for highly multiplexed target capture and sequencing. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2010(6), db.prot5448.
- Meyer, M., Kircher, M., Gansauge, M.-T., ... Pääbo, S. (2012). A high-coverage genome sequence from an archaic Denisovan individual. *Science*, 338(6104), 222–226.
- Miller, W., Drautz, D. I., Ratan, A., ... Schuster, S. C. (2008). Sequencing the nuclear genome of the extinct woolly mammoth. *Nature*, 456(7220), 387–390.
- Mosca Torres, M. E., de Porras, M. E., ja Aschero, C. A. (2022). Early-to-Middle Holocene environmental reconstruction in the southern Puna (26° S, Argentina) from camelid coprolite records. *Journal of South American Earth Sciences*, 116, 103805.
- Noonan, J. P., Coop, G., Kudaravalli, S., ... Rubin, E. M. (2006). Sequencing and analysis of Neanderthal genomic DNA. *Science*, 314(5802), 1113–1118.

- Noonan, J. P., Hofreiter, M., Smith, D., Priest, J. R., Rohland, N., Rabeder, G., Krause, J.,
 Detter, J. C., Pääbo, S., ja Rubin, E. M. (2005). Genomic sequencing of Pleistocene cave
 bears. *Science*, 309(5734), 597–599.
- Orlando, L., Allaby, R., Skoglund, P., ... Warinner, C. (2021). Ancient DNA analysis. *Nature
 Reviews Methods Primers*, 1(1), 1–26.
- Orlando, L., ja Cooper, A. (2014). Using Ancient DNA to Understand Evolutionary and
 Ecological Processes. *Annual review of ecology, evolution, and systematics*, 45(1), 573–
 598.
- Oskam, C. L., Haile, J., McLay, E., ... Bunce, M. (2010). Fossil avian eggshell preserves ancient
 DNA. *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society*, 277(1690), 1991–2000.
- O’Sullivan, N. J., Teasdale, M. D., Mattiangeli, V., Maixner, F., Pinhasi, R., Bradley, D. G., ja
 Zink, A. (2016). A whole mitochondria analysis of the Tyrolean Iceman’s leather
 provides insights into the animal sources of Copper Age clothing. *Scientific Reports*, 6,
 31279.
- Pääbo, S., Gifford, J. A., ja Wilson, A. C. (1988). Mitochondrial DNA sequences from a 7000-
 year old brain. *Nucleic Acids Research*, 16(20), 9775–9787.
- Palkopoulou, E., Mallick, S., Skoglund, P., ... Dalén, L. (2015). Complete genomes reveal
 signatures of demographic and genetic declines in the woolly mammoth. *Current
 Biology: CB*, 25(10), 1395–1400.
- Parducci, L., Jørgensen, T., Tollefsrud, M. M., ... Willerslev, E. (2012). Glacial survival of boreal
 trees in northern Scandinavia. *Science*, 335(6072), 1083–1086.
- Parker, C., Rohrlach, A. B., Friederich, S., Nagel, S., Meyer, M., Krause, J., Bos, K. I., ja Haak,
 W. (2020). A systematic investigation of human DNA preservation in medieval
 skeletons. *Scientific Reports*, 10(1), 18225.
- Patzold, F., Zilli, A., ja Hundsdoerfer, A. K. (2020). Advantages of an easy-to-use DNA

- extraction method for minimal-destructive analysis of collection specimens. *PloS One*, 15(7), e0235222.
- Pečnerová, P. C. (2016, veebruar 22). *Petrous bone is the new black*. The Molecular Ecologist. <https://www.molecular ecologist.com/2016/02/22/petrous-bone-is-the-new-black/>
- Pedersen, M. W., Ruter, A., Schweger, C., ... Willerslev, E. (2016). Postglacial viability and colonization in North America's ice-free corridor. *Nature*, 537(7618), 45–49.
- Picard. (2023, mai 18). <http://broadinstitute.github.io/picard/>
- Pinhasi, R., Fernandes, D., Sirak, K., ... Hofreiter, M. (2015). Optimal Ancient DNA Yields from the Inner Ear Part of the Human Petrous Bone. *PloS One*, 10(6), e0129102.
- Poinar, H. N., Schwarz, C., Qi, J., ... Schuster, S. C. (2006). Metagenomics to paleogenomics: large-scale sequencing of mammoth DNA. *Science*, 311(5759), 392–394.
- Prendergast, M. E., ja Sawchuk, E. (2018). Boots on the ground in Africa's ancient DNA „revolution“: archaeological perspectives on ethics and best practices. *Antiquity*, 92(363), 803–815.
- Ramos-Madrigal, J., Runge, A. K. W., Bouby, L., ... Wales, N. (2019). Palaeogenomic insights into the origins of French grapevine diversity. *Nature Plants*, 5(6), 595–603.
- Ramos-Madrigal, J., Smith, B. D., Moreno-Mayar, J. V., Gopalakrishnan, S., Ross-Ibarra, J., Gilbert, M. T. P., ja Wales, N. (2016). Genome Sequence of a 5,310-Year-Old Maize Cob Provides Insights into the Early Stages of Maize Domestication. *Current Biology: CB*, 26(23), 3195–3201.
- Rasmussen, M., Guo, X., Wang, Y., ... Willerslev, E. (2011). An Aboriginal Australian genome reveals separate human dispersals into Asia. *Science*, 334(6052), 94–98.
- Rasmussen, M., Li, Y., Lindgreen, S., ... Willerslev, E. (2010). Ancient human genome sequence of an extinct Palaeo-Eskimo. *Nature*, 463(7282), 757–762.
- Rawlence, N. J., Wood, J. R., Armstrong, K. N., ja Cooper, A. (2009). DNA content and

- distribution in ancient feathers and potential to reconstruct the plumage of extinct avian taxa. *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society*, 276(1672), 3395–3402.
- Reich, D., Green, R. E., Kircher, M., ... Pääbo, S. (2010). Genetic history of an archaic hominin group from Denisova Cave in Siberia. *Nature*, 468(7327), 1053–1060.
- Rohland, N., Glocke, I., Aximu-Petri, A., ja Meyer, M. (2018). Extraction of highly degraded DNA from ancient bones, teeth and sediments for high-throughput sequencing. *Nature Protocols*, 13(11), 2447–2461.
- Rohland, N., Harney, E., Mallick, S., Nordenfelt, S., ja Reich, D. (2015). Partial uracil-DNA-glycosylase treatment for screening of ancient DNA. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 370(1660), 20130624.
- Rohland, N., ja Hofreiter, M. (2007). Ancient DNA extraction from bones and teeth. *Nature Protocols*, 2(7), 1756–1762.
- Rohland, N., ja Reich, D. (2012). Cost-effective, high-throughput DNA sequencing libraries for multiplexed target capture. *Genome Research*, 22(5), 939–946.
- Schuenemann, V. J., Peltzer, A., Welte, B., ... Krause, J. (2017). Ancient Egyptian mummy genomes suggest an increase of Sub-Saharan African ancestry in post-Roman periods. *Nature Communications*, 8, 15694.
- Segesdi, M., Botfalvai, G., Bodor, E. R., Ósi, A., Buczkó, K., Dallos, Z., Tokai, R., ja Földes, T. (2017). First report on vertebrate coprolites from the Upper Cretaceous (Santonian) Csehbánya Formation of Iharkút, Hungary. *Cretaceous Research*, 74, 87–99.
- Sirak, K. A., Fernandes, D. M., Cheronet, O., ... Pinhasi, R. (2017). A minimally-invasive method for sampling human petrous bones from the cranial base for ancient DNA analysis. *BioTechniques*, 62(6), 283–289.
- Sirak, K., Fernandes, D., Cheronet, O., ... Pinhasi, R. (2020). Human auditory ossicles as an alternative optimal source of ancient DNA. *Genome Research*, 30(3), 427–436.

- Skoglund, P., Storå, J., Götherström, A., ja Jakobsson, M. (2013). Accurate sex identification of ancient human remains using DNA shotgun sequencing. *Journal of archaeological science*, 40(12), 4477–4482.
- Slon, V., Hopfe, C., Weiß, C. L., ... Meyer, M. (2017). Neandertal and Denisovan DNA from Pleistocene sediments. *Science*, 356(6338), 605–608.
- Spyrou, M. A., Bos, K. I., Herbig, A., ja Krause, J. (2019). Ancient pathogen genomics as an emerging tool for infectious disease research. *Nature Reviews. Genetics*, 20(6), 323–340.
- Sugita, N., Ebihara, A., Hosoya, T., Jinbo, U., Kaneko, S., Kurosawa, T., Nakae, M., ja Yukawa, T. (2020). Non-destructive DNA extraction from herbarium specimens: a method particularly suitable for plants with small and fragile leaves. *Journal of Plant Research*, 133(1), 133–141.
- Suyama, Y., Kawamuro, K., Kinoshita, I., Yoshimura, K., Tsumura, Y., ja Takahara, H. (1996). DNA sequence from a fossil pollen of *Abies* spp. from Pleistocene peat. *Genes & Genetic Systems*, 71(3), 145–149.
- Taberlet, P., Coissac, E., Pompanon, F., Gielly, L., Miquel, C., Valentini, A., Vermet, T., Corthier, G., Brochmann, C., ja Willerslev, E. (2007). Power and limitations of the chloroplast trnL (UAA) intron for plant DNA barcoding. *Nucleic Acids Research*, 35(3), e14.
- Teasdale, M. D., van Doorn, N. L., Fiddymment, S., Webb, C. C., O'Connor, T., Hofreiter, M., Collins, M. J., ja Bradley, D. G. (2015). Paging through history: parchment as a reservoir of ancient DNA for next generation sequencing. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 370(1660), 20130379.
- Vallebuena-Estrada, M., Rodríguez-Arévalo, I., Rougon-Cardoso, A., Martínez González, J., García Cook, A., Montiel, R., ja Vielle-Calzada, J.-P. (2016). The earliest maize from San

- Marcos Tehuacán is a partial domesticate with genomic evidence of inbreeding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(49), 14151–14156.
- van der Valk, T., Pečnerová, P., Díez-Del-Molino, D., ... Dalén, L. (2021). Million-year-old DNA sheds light on the genomic history of mammoths. *Nature*, 591(7849), 265–269.
- Vilgalys, T. P., Klunk, J., Demeure, C. E., ... Barreiro, L. B. (2023). Reply to Barton et al: signatures of natural selection during the Black Death. *bioRxiv : The Preprint Server for Biology*, 2023.04.06.535944.
- Wagner, S., Lagane, F., Seguin-Orlando, A., ... Orlando, L. (2018). High-Throughput DNA sequencing of ancient wood. *Molecular Ecology*, 27(5), 1138–1154.
- Warinner, C., Rodrigues, J. F. M., Vyas, R., ... Cappellini, E. (2014). Pathogens and host immunity in the ancient human oral cavity. *Nature Genetics*, 46(4), 336–344.
- Weiβ, C. L., Schuenemann, V. J., Devos, J., Shirsekar, G., Reiter, E., Gould, B. A., Stinchcombe, J. R., Krause, J., ja Burbano, H. A. (2016). Temporal patterns of damage and decay kinetics of DNA retrieved from plant herbarium specimens. *Royal Society Open Science*, 3(6), 160239.
- Willerslev, E., Davison, J., Moora, M., ... Taberlet, P. (2014). Fifty thousand years of Arctic vegetation and megafaunal diet. *Nature*, 506(7486), 47–51.

Kasutatud veebiaadressid.

<https://www.putty.org/> (28.02.2022)

<https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/dna-purification/genomic-dna/dneasy-blood-and-tissue-kit> (10.01.2023)

<https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/dna-purification/microbial-dna/dneasy-powersoil-pro-kit> (22.02.2023)

<https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/dna-purification/genomic-dna/qiaamp-powerfecal-pro-dna-kit> (22.02.2023)

<https://www.beckman.com/reagents/genomic/cleanup-and-size-selection/pcr> (24.04.2023)

<https://www.skullsunlimited.com/products/real-human-inner-ear-ossicle-set> (21.05.2023)

<https://www.illumina.com/> (23.05.2023)

<https://astatsa.com/WilcoxonTest/> (25.05.2023)

Lisad

Lisa 1. Eraldatud DNA ekstraktide kontsentratsioonid

Standard 1	51,79 ng/ml	0,05179 ng/ul
Standard 2	20100,6 ng/ml	20,1006 ng/ul

0 = <0.5 ng/ul

Hambad

Proovi ID	I mõõtmine (ng/μl)	II mõõtmine (ng/μl)	III mõõtmine (ng/μl)	Ekstraktid keskmine DNA sisaldus (ng/μl)
KOY001A	4,320	4,300	4,240	4,287
KOY002A	0,120	0,122	0,116	0,119
MHG001A	2,380	2,360	2,300	2,347
TAA002A	1,860	1,880	1,880	1,873
TAA003A	0,322	0,324	0,316	0,321
TAA004A	0,000	0,110	0,000	0,037
TAA005A	0,388	0,392	0,348	0,376
Blank	0,000	0,000	0,000	0,000

Hambakivi

Proovi ID	I mõõtmine (ng/μl)	II mõõtmine (ng/μl)	III mõõtmine (ng/μl)	Ekstraktid keskmine DNA sisaldus (ng/μl)
LOH001A	5,060	5,060	5,040	5,053
MAK002B	1,860	1,870	1,850	1,860
MAL008	3,880	3,880	3,840	3,867
TAT007	8,820	8,820	8,920	8,853
TPM005	0,212	0,208	0,204	0,208
TPM006	3,020	3,020	3,020	3,020
TPM007	5,900	5,800	5,920	5,873
Blank	0,000	0,000	0,000	0,000

Nahk

Proovi ID	I mõõtmise (ng/μl)	II mõõtmise (ng/μl)	III mõõtmise (ng/μl)	Ekstraktid keskmine DNA sisaldus (ng/μl)	Lüüsimise aeg (h)
MHG001C.3	3,240	3,160	3,200	3,200	24
MHG001C.4	1,760	1,760	1,730	1,750	
MHG001D.3	8,740	8,700	8,700	8,713	
MHG001D.4	0,846	0,840	0,804	0,830	
Blank	0,000	0,000	0,000	0,000	
MHG001C.5	4,460	4,440	4,500	4,467	48
MHG001C.6	1,990	1,980	1,980	1,983	
MHG001D.5	4,980	5,020	4,980	4,993	
MHG001D.6	2,380	2,380	2,380	2,380	
Blank	0,000	0,000	0,000	0,000	
MHG001C.1	1,490	1,470	1,480	1,480	72
MHG001C.2	4,200	4,400	4,400	4,333	
MHG001D.1	3,020	3,040	3,000	3,020	
MHG001D.2	3,160	3,160	3,160	3,160	
Blank	0,000	0,000	0,000	0,000	

Koproliit

Proovi ID	I mõõtmise (ng/μl)	II mõõtmise (ng/μl)	III mõõtmise (ng/μl)	Ekstraktid keskmine DNA sisaldus (ng/μl)	Kaal (mg)
HTG001A.1	1,350	1,380	1,360	1,363	256,18
HTG001B.1	0,568	0,568	0,570	0,569	272,99
HTG001C.1	1,480	1,460	1,480	1,473	268,13
HTG001D.1	0,588	0,578	0,588	0,585	256,01
Blank	0,000	0,000	0,000	0,000	
HTG001A.2	2,160	2,080	2,080	2,107	256,18
HTG001B.2	0,706	0,688	0,692	0,695	272,99
HTG001C.2	1,440	1,370	1,360	1,390	268,13
HTG001D.2	1,610	1,620	1,610	1,613	256,01
HTG001E.1	3,920	3,840	3,840	3,867	121,21
HTG001F.1	8,100	7,920	7,660	7,893	128,40
Blank	0,000	0,000	0,000	0,000	

Pinnas

Proovi ID	I mõõtmise (ng/μl)	II mõõtmise (ng/μl)	III mõõtmise (ng/μl)	Ekstraktid keskmine DNA sisaldus (ng/μl)	Kaal (mg)
REI002	0,1260	0,0000	0,0000	0,0420	332,6
REI004	0,1820	0,1840	0,1760	0,1807	259,88
REI006	2,3400	2,3200	2,3200	2,3267	241,92
REI009	3,2000	3,2000	3,2600	3,2200	241,33
REI014	2,2800	2,2400	2,2400	2,2533	231,85
REI017	1,4400	1,4200	1,1400	1,3333	233,83
Blank	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	
SLJ002	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	287,6
SLJ003	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	238,85
SLJ004	0,0000	0,1020	0,0000	0,0340	258,9
SLJ006	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	258,81
SLJ007	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	277,3
SLJ008	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	253,5
Blank	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	

Lisa 2. Raamatukogude protokollide võrdluseks kasutatud protokollide lehed

Meyer&Kircher

		Proovide arv				
Reagendid	Maht (µl)	8				
1 Fragmentide otste täitmine						30 min - 20 ° C Sisestatud DNA kogus on prooviti erinev vt failist Ekstraktide kontsentratsiooni d - Hambad
DNA ekstrakt	Tuubi kohta	Kokku	Kokku + 1	Algkontsentratsioon	Lõppkontsentratsioon	
Steriilne vesi	13					
Reaction Buffer	29,5	236	265,5			
Enzyme Mix (T4	5	40	45	10 x	1 x	
	2,5	20	22,5	Polymerase), 10	Polymerase), 0.5 U/µl	
	37	296	333			
Puhastus. Minelute kit. Elueeri 30 ul EB puhvriga						
2 Adapterite ligeerimine						15 min - 20 ° C
eelmisest	Tuubi kohta	Kokku	Kokku + 1	Algkontsentratsioon	Lõppkontsentratsioon	
Quick Ligation Reaction Buffer (5x)	30					
Adaptor mix (2.5 µM)	10	80	90	5 x	1 x	
Quick T4 DNA Ligase (2,000 U/µl)	5	40	45	2.5 µM	0.25 µM	
	5	40	45	2000 U/µl	200 U/µl	
	20	160	180			
Puhastus. Minelute kit. Elueeri 30 ul EB puhvriga						
3 Adapterite otste täitmine						30 min - 37 ° C; 20 min - 80 ° C
Puhastatud DNA eelmisest reaktsioonist	Tuubi kohta	Kokku	Kokku + 1	Algkontsentratsioon	Lõppkontsentratsioon	
Steriilne vesi	30					
Thermopol Buffer (10x)	12,2	97,6	109,8			
dNTP-d (iga dNTP 25 mM)	5	40	45	10 x	1 x	
Bst DNA Polymerase, LF (8 U/µl)	0,8	6,4	7,2	iga dNTP 25 mM	iga dNTP 0.4 mM	
	2	16	18	8 U/µl	0.32 U/µl	
	20	160	180			
4 DNA-fragmentide amplifitseerimine						
Valmistage ette ja märgistage kaks PCR tuubi proovi kohta. Valmistage PCR põhisegu ja pipeteerige 142 µl tuubidest esimesse						
	Reaktsiooni kohta	Kokku	Kokku + 2	Algkontsentratsioon	Lõppkontsentratsioon	
Steriilne vesi	42	672	840			
10x PCR buffer	10	160	200	10 x	1 x	
MgCl (25 mM)	10	160	200	25 mM	2.5 mM	
BSA (20 mg/ml)	5	80	100	0.02 mg/µl	0.001 mg/µl	
dNTP-d (iga dNTP 10 mM)	2	32	40	iga dNTP 10 mM	iga dNTP 0.2 mM	
HGS Taq Diamond (5 U/µl)	2	32	40	5 U/µl	0.1 U/µl	
	71	1136	1420			
						* Vajadusel kasuta 5 ml tuubi.

Seejärel lisa 4 µl mõlemat indekseerimispraimerit ja sega pipetiga. Lisa eelmine reaktsioonisegu koos DNA-ga. Seda pipetiga korralikult ja tsentrifuugi tuubid ning pipeteeri 100 µl teise tuubi.

	Algkontsentratsioon		Lõppkontsentratsioon		**NEBNext® Multiplex Oligos for Illumina® (Dual Index Primers Set 1&2)
indekseerimispraimer i7 (10 µM)	2	4	4	10 µM	0.2 µM
indekseerimispraimer i5 (10 µM)	2	4	4	10 µM	0.2 µM
Adapterite otste täitmise reaktsiooni puhastatud DNA	25		50		

SET: 1

Proovi ID	i7	i5
1 TAA002A SG1	i717	i512
2 TAA003A SG1	i724	i506
3 TAA004A SG1	i701	i505
4 TAA005A SG1	i703	i503
5 KOY001A SG1	i705	i501
6 KOY002A SG1	i708	i516
7 EBkHN230410 SG1	i718	i506
8 LBkHN230505a	i719	i505

SET: 2

Proovi ID	i7	i5
9		
10		
11		
12		
13		
14		
15		
16		

Meyer&Kircher lisa puhastusega

		Proovide arv				
Reagentid	Maht (ul)	8				
1 Fragmentide otste täitmine						30 min - 20 ° C
DNA ekstrakt	Tuubi kohta 13	Kokku	Kokku + 1	Algkontsentratsioon	Lõppkontsentratsioon	Sisestatud DNA koostis on prooviti erinev vt failist Ekstraktide kontsentratsioonid - Hambad
Steriilne vesi	29,5	236	265,5			
End Repair Reaction Buffer (10x)	5	40	45	10 x	1 x	
End Repair Enzyme Mix (T4 DNA Polymerase (4 U/μl), T4 Polynucleotide Kinase (10 U/μl))	2,5	20	22,5	4 U/μl (T4 DNA Polymerase), 10 U/μl (T4 Polynucleotide Kinase)	0.2 U/μl (T4 DNA Polymerase), 0.5 U/μl (T4 Polynucleotide Kinase)	
	37	296	333			
Puhastus. Minelute kit. Elueeri 30 ul EB puhvriga						
2 Adapterite ligeerimine						15 min - 20 ° C
Puhastatud DNA eelmisest reaktsioonist	Tuubi kohta 30	Kokku	Kokku + 1	Algkontsentratsioon	Lõppkontsentratsioon	
Quick Ligation Reaction Buffer (5x)	10	80	90	5 x	1 x	
Adaptor mix (2.5 μM)	5	40	45	2.5 μM	0.25 μM	
Quick T4 DNA Ligase (2,000 U/μl)	5	40	45	2000 U/μl	200 U/μl	
	20	160	180			
Puhastus. Minelute kit. Elueeri 30 ul EB puhvriga						
3 Adapterite otste täitmine						30 min - 37 ° C; 20 min - 80 ° C
Puhastatud DNA eelmisest reaktsioonist	Tuubi kohta 30	Kokku	Kokku + 1	Algkontsentratsioon	Lõppkontsentratsioon	
Steriilne vesi	12,2	97,6	109,8			
Thermopol Buffer (10x)	5	40	45	10 x	1 x	
dNTP-d (igat NTPd 25 mM)	0,8	6,4	7,2	25 mM mM igat NTPd	0.4 mM mM igat NTPd	
Bst DNA Polymerase, LF (8 U/μl)	2	16	18	8 U/μl	0.32 U/μl	
	20	160	180			
Puhastus. Minelute kit. Elueeri 50 ul EB puhvriga						
4 DNA-fragmentide amplifitseerimine						
Valmistage ette ja märgistage kaks PCR tuubi proovi kohta. Valmistage PCR põhisegu ja pipeteerige 142 μl tuubidest esimesse tuubi.						
	Reaktsiooni koht	Kokku	Kokku + 2	Algkontsentratsioon	Lõppkontsentratsioon	
Steriilne vesi	42	672	840			
10x PCR buffer	10	160	200	10 x	1 x	
MgCl (25 mM)	10	160	200	25 mM	2.5 mM	
BSA (20 mg/ml)	5	80	100	0.02 mg/μl	0.001 mg/μl	
dNTP-d (iga dNTP 10 mM)	2	32	40	iga dNTP 10 mM	iga dNTP 0.2 mM	
HGS Taq Diamond (5 U/μl)	2	32	40	5 U/μl	0.1 U/μl	
	71	1136	1420			
						* Vajadusel kasuta 5 ml tuubi.

Seejärel lisa 4 µl mõlemat indekseerimispraimerit ja sega pipetiga. Lisa eelmisest reaktsioonist 50 µl puhastatud aDNA-d. Sega pipetiga korralikult ja tsentrifuugi tuubid ning pipeteeri 100 µl teise tuubi.

	Algkontsentratsioon		Lõppkontsentratsioon		
indekseerimisprimer i7 (10 µM)	2	4	4	10 µM	0.2 µM
indekseerimisprimer i5 (10 µM)	2	4	4	10 µM	0.2 µM
täitmise reaktsiooni	25		50		

SET: 1

Proovi ID	i7	i5
1 TAA002A SG2	i720	i504
2 TAA003A SG2	i722	i502
3 TAA004A SG2	i724	i501
4 TAA005A SG2	i701	i516
5 KOY001A SG2	i702	i515
6 KOY002A SG2	i703	i514
7 EBkHN230410 SG2	i704	i513
8 LBkHN230505b	i705	i512

SET: 2

Proovi ID	i7	i5
9		
10		
11		
12		
13		
14		
15		
16		

BEST

Reagendid		Maht (µl)		Proovide arv		8		
1 Fragmentide otste täitmine						30 min - 20 ° C 30 min - 65 ° C		
	Tuubi kohta	Kokku	Kokku + 1	Algkontsentratsioon	Lõppkontsentratsioon			
DNA ekstrakt	13					Adapterite suhe : DNA, 25:1; sisestatav DNA kogus on prooviti erinev vt failist Ekstraktide kontsentratsioonid - Hambad Sega reaktsioonisegu reagentid omavahel kokku ja jaga 3,01 µl kaupa tuubidesse. Lisa DNA ekstrakt reaktsioonisegule ja sega korralikult. Eemalda mullid, tsentrifuugi ja pane proovid termotsüklerisse.		
Steriilne vesi	0	0	0					
Reaktsioonivõimendi	1	8	9					
T4 DNA Polymerase (3 U/µl),	0,01	0,08	0,09	3 U/µl	0,002 U/µl			
T4 Polynucleotide Kinase (10 U/µl)	0,1	0,8	0,9	10 U/µl	0.06 U/µl			
T4 DNA Ligase Reaction Buffer (10 x)	1,6	12,8	14,4	10 x	1 x			
dNTP-d (iga dNTP 25 mM)	0,3	2,4	2,7	iga dNTP 25 mM	iga dNTP 0.5 mM			
	3,01	24,08	27,09					
2 Adapterite ligeerimine						30 min - 20 ° C 10 min - 65 ° C		
Fragmentide otste täitmise reaktsioonisegu koos DNA-ga		16,01				Adapterisegu kontsentratsioon on prooviti erinev vt failist Ekstraktide kontsentratsioonid - Hambad Sega adapterite lisamise reaktsioonisegu reagentid omavahel kokku ja lisa 3 µl igasse tuubi. Segi korralikult, nipsuta tuubi selleks. Eemalda mullid, tsentrifuugi ja pane proovid termotsüklerisse.		
BEDC3 adapterite segu		1						
PEG 4000-st (Sigma Aldrich, 50%)		2,5	20	22,5	50%			6,58%
T4 DNA Ligase Reaction Buffer (10x)		0,4	3,2	3,6	10 x			0.2 x
T4 DNA ligase (400 U/µl)		0,1	0,8	0,9	400 U/µl			2 U/µl
		3	24	27				
3 Adapterite otste täitmine						20 min - 65 ° C 20 min - 80 ° C		
		Tuubi kohta	Kokku	Kokku + 1	Algkontsentratsioon	Lõppkontsentratsioon		
Adapteri ligeerimise reaktsioonisegu koos DNA-ga		20,01					Sega reaktsioonisegu reagentid omavahel kokku ja lisa 10 µl igasse tuubi. Segi korralikult. Eemalda mullid, tsentrifuugi ja pane proovid eelsoojendatud termotsüklerisse. Pärast tsükli lõppu jahuta tuubid temperatuurini 4 ° C.	
dNTP-d (iga dNTP 25 mM)		0,3	2,4	2,7	iga dNTP 25 mM	iga dNTP 0.26 mM		
Isothermal Amplification Buffer (10x)		3	24	27	10 x	1 x		
Steriilne vesi		6,2	49,6	55,8				
Warmstart Polymerase (8 U/µl)		0,5	4	4,5	8 U/µl	0.55 U/µl		
		10	80	90				
Puhastus. Minelute. Elueeri 40 µl EB puhvriga (vastavalt tootja juhistele)								
PB puhver		150,05 µl						
Tsentrifuug		max kiirus		1	min			
Eemalda läbivool								
PE puhver		750 µl						
Tsentrifuug		max kiirus		1	min			
Eemalda läbivool								
Tsentrifuug		max kiirus		1	min			
Vaheta tuubid								
EB puhver		40 µl						
Termoblokk		37 ° C		1	min			
Tsentrifuug		max kiirus		1	min			
Eemalda filter								
4 DNA-fragmentide amplifitseerimine								
eelmisest reaktsioonist		20						
	Reaktsiooni kohta	Kokku	Kokku + 1	Algkontsentratsioon	Lõppkontsentratsioon			
Steriilne vesi		51,2	410	460,8				
AmpliAq Gold buffer (Applied Biosystems)(10x)		10	80	90	10X	1X		
MgCl (25 mM)		10	80	90	25 mM	2.5 mM		
BSA (20 µg/µl)		2	16	18	20 µg/µl	0.8 µg/µl		
dNTP-d (iga dNTP 25 mM)		0,8	6	7,2	iga dNTP 25 mM	iga dNTP 0.2 mM		
AmpliAq Gold polymerase (5 U/µl)		2	16	18	5 U/µl	0.1 U/µl		
		76	608	684				

Seejärel lisa 1 µl mõlemat indekseerimispraimerit ja sega pipetiga. Lisa eelmine reaktsioonisegu koos DNA-ga. Seda pipetiga korralikult ja tsentrifuugi tuubid.

		Algkontsentratsioon	Lõppkontsentratsioon	
indekseerimisprimer i7 (10 µM)	2	10 µM	0.2 µM	**NEBNext® Multiplex Oligos for Illumina® (Dual Index Primers Set 1&2)
indekseerimisprimer i5 (10 µM)	2	10 µM	0.2 µM	
reaktsiooni puhastatud	20			

SET: 1

Proovi ID	i7	i5
1 TAA002A SG3	i707	i510
2 TAA003A SG3	i709	i508
3 TAA004A SG3	i710	i507
4 TAA005A SG3	i711	i506
5 KOY001A SG3	i712	i505
6 KOY002A SG3	i713	i504
7 EBkHN230410 SG3	i714	i503
8 LBkHN230502c	i715	i502

SET: 2

Proovi ID	i7	i5
9		
10		
11		
12		
13		
14		
15		
16		

BEST puhastuseta

Reagendid	Maht (µl)	Proovide arv 8				
1 Fragmentide otste täitmine	Tuubi kohta	Kokku	Kokku + 1	Algkontsentratsioon	Lõppkontsentratsioon	30 min - 20 ° C 30 min - 65 ° C Adapterite suhe : DNA, 25:1; sisestav DNA kogus on prooviti erinev vt failist Ekstraktide kontsentratsioonid - Hambad Sega reaktsioonisegu reagentid omavahel kokku ja jaga 3,01 µl kaup tuubidesse. Lisa DNA ekstrakt reaktsioonisegule ja sega korralikult. Eemalda mullid, tsentrifuugi ja pane proovid termotsüklerisse.
DNA ekstrakt	13					
Steriilne vesi	0	0	0			
Reaktsioonivõimendi	1	8	9			
T4 DNA Polymerase (3 U/µl),	0,01	0,08	0,09	3 U/µl	0.002 U/µl	
T4 Polynucleotide Kinase (10 U/µl)	0,1	0,8	0,9	10 U/µl	0.06 U/µl	
T4 DNA Ligase Reaction Buffer (10 x)	1,6	12,8	14,4	10 x	1 x	
dNTP-d (iga dNTP 25 mM)	0,3	2,4	2,7	iga dNTP 25 mM	iga dNTP 0.5 mM	
	3,01	24,08	27,09			

2 Adapterite ligeerimine	Tuubi kohta	Kokku	Kokku + 1	Algkontsentratsioon	Lõppkontsentratsioon	30 min - 20 ° C 10 min - 65 ° C Adapterisegu kontsentratsioon on prooviti erinev vt failist Ekstraktide kontsentratsioonid - Hambad Sega adapterite lisamise reaktsioonisegu reagentid omavahel kokku ja lisa 3 µl igasse tuubi. Segi korralikult, nipsuta tuubi selleks. Eemalda mullid, tsentrifuugi ja pane proovid termotsüklerisse.
Fragmentide otste täitmise reaktsioonisegu koos DNA-ga	16,01					
BEDC3 adapterite segu	1					
PEG 4000-st (Sigma Aldrich, 50%)	2,5	20	22,5	50%	6,58%	
T4 DNA Ligase Reaction Buffer (10x)	0,4	3,2	3,6	10 x	0.2 x	
T4 DNA ligase (400 U/µl)	0,1	0,8	0,9	400 U/µl	2 U/µl	
	3	24	27			

3 Adapterite otste täitmine	Tuubi kohta	Kokku	Kokku + 1	Algkontsentratsioon	Lõppkontsentratsioon	20 min - 65 ° C 20 min - 80 ° C Sega reaktsioonisegu reagentid omavahel kokku ja lisa 10 µl igasse tuubi. Segi korralikult. Eemalda mullid, tsentrifuugi ja pane proovid eelsoojendatud termotsüklerisse. Pärast tsükli lõppu jahuta tuubid temperatuurini 4 ° C.
Adapteri ligeerimise reaktsioonisegu koos DNA-ga	20,01					
dNTP-d (iga dNTP 25 mM)	0,3	2,4	2,7	iga dNTP 25 mM	iga dNTP 0.26 mM	
Isothermal Amplification Buffer (10x)	3	24	27	10 x	1 x	
Steriilne vesi	6,2	49,6	55,8			
Warmstart Polymerase (8 U/µl)	0,5	4	4,5	8 U/µl	0.55 U/µl	
	10	80	90			

4 DNA-fragmentide amplifitseerimine	Reaktsiooni kohta	Kokku	Kokku + 1	Algkontsentratsioon	Lõppkontsentratsioon	
eelmisest reaktsioonist	20					
Steriilne vesi	51,2	410	460,8			
AmpliTag Gold buffer (Applied Biosystems)(10x)	10	80	90	10X	1X	
MgCl (25 mM)	10	80	90	25 mM	2.5 mM	
BSA (20 µg/µl)	2	16	18	20 µg/µl	0.8 µg/µl	
dNTP-d (iga dNTP 25 mM)	0,8	6	7,2	iga dNTP 25 mM	iga dNTP 0.2 mM	
AmpliTag Gold polymerase (5 U/µl)	2	16	18	5 U/µl	0.1 U/µl	
	76	608	684			

Seejärel lisa 1 µl mõlemat indekseerimispraimerit ja sega pipetiga. Lisa eelmine reaktsioonisegu koos DNA-ga. Seda pipetiga korralikult ja tsentrifuugi tuubid.

		Algkontsentratsioon	Lõppkontsentratsioon	
indekseerimisprimer i7 (10 µM)	2	10 µM	0.2 µM	**NEBNext® Multiplex Oligos for Illumina® (Dual Index Primers Set 1&2)
indekseerimisprimer i5 (10 µM)	2	10 µM	0.2 µM	
reaktsiooni puhastatud	20			

SET: 1

Proovi ID	i7	i5
1 TAA002A SG3	i707	i510
2 TAA003A SG3	i709	i508
3 TAA004A SG3	i710	i507
4 TAA005A SG3	i711	i506
5 KOY001A SG3	i712	i505
6 KOY002A SG3	i713	i504
7 EBkHN230410 SG3	i714	i503
8 LBkHN230502c	i715	i502

SET: 2

Proovi ID	i7	i5
9		
10		
11		
12		
13		
14		
15		
16		

Lihtlitsents

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Helja Niinemäe,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose

“DNA eraldamise ja genoomsete raamatukogude valmistamise metoodikate analüüs erinevate bioarheoloogiliste materjalide alusel”,

mille juhendaja on prof. Kristiina Tambets ja dr. Lehti Saag,

reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Helja Niinemäe

30.05.2023