

Ebola virus sequencing protocol

Nanopore | amplicon | native barcoding

Document: ARTIC-EBOV-seqSOP-fr-v2.0.0

Creation Date: 2019-12-06

Revision Date: 2019-12-06

Forked from: doi:10.1038/nprot.2017.066

Author: Luke Meredith, Josh Quick

Licence: Creative Commons Attribution 4.0 International License

Overview: Le protocole suivant est adapté de la méthode présentée dans Quick et al. (2017) *Nature Protocols* **12**: 1261–1276 doi:10.1038/nprot.2017.066 [↗](#) et traite des amorces, de la préparation et purification des amplicons, puis utilise un protocole tube-unique pour ligaturer la librairie avant de séquencer sur minION.

Ce document fait partie de la collection sur le protocole de séquençage du virus Ebola par Nanopore :

<http://artic.network/ebov/> [↗](#)

Documents:

Plan des amorces Ebola :

<https://github.com/artic-network/primer-schemes/tree/master/ZaireEbola/V3> [↗](#)

Protocole de séquençage du virus Ebola par Nanopore :

<http://artic.network/ebov/ebov-seq-sop.html> [↗](#)

Ebola virus Nanopore sequencing kit-list :

<http://artic.network/ebov/ebov-seq-kit.html> [↗](#)



Funded by the Wellcome Trust

Collaborators Award 206298/Z/17/Z --- ARTIC network (artic.network)

Préparation

Equipements nécessaires :

- 2 Hotte portative de préparation d'acides nucléiques ou équivalent
- 1 vortex 12V
- 1 Centrifugeuse portable Sprout
- 1 Pipette Eppendorf P1000
- 1 Pipette Eppendorf P100
- 1 Pipette Eppendorf P10
- 1 Support convertible de tubes 1.5mL/0.6mL
- 1 Fluoromètre Quantus
- 1 Machine miniPCR.
- 1 Bloc chauffant
- 1 Support magnétique

Consommables nécessaires :

Reverse Transcriptase SuperScript IV
Q5 Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix
Amorces Ebola Zaire V3
NEBNext Ultra II End Repair/dA-Tailing Module
Blunt/TA Ligase Master Mix
Aline PCRCLEAN DX 50ml
Nanopore Ligation Sequencing Kit 1D
Nanopore Native Barcoding Expansion Kit
Nanopore R9.4.1 Flow cell
Tubes Eppendorf 1.5mL
Barettes de 8-tubes 0.2mL
Tubes Falcon 50mL
Tubes PCR 0.5ml
Système QuantiFluor ONE dsDNA
Eau Nuclease-free
Ethanol à 70%
Cônes de pipette P1000
Cônes de pipette P100
Cônes de pipette P10 long (long-reach)
Papier absorbant
Conteneurs de déchets médicaux tranchants

Recommandations de sécurité, de confinement et de contamination

Robe de laboratoire hydrophobe à nouer dans le dos
Gants
Stérilisateurs à lumière UV
Lingettes de décontamination MediPal
Réactifs DNAAway and RNase Zap

Protocole

Partie 1 : Synthèse d'ADNc avec la reverse transcriptase Superscript IV

NOTE SUR LA PRÉPARATION DE LA HOTTE : Pour prévenir les contaminations croisées de l'échantillon ou d'autres réactifs, cette étape doit être effectuée dans la HOTTE DE PRÉPARATION D'ÉCHANTILLONS, qui est pré-stérilisée aux UV et traitée avec des lingettes MediPal, et les réactifs DNABase et RNaseZap. Nettoyer la hotte avec chacun des produits séquentiellement, avec 5 minutes de séchage entre passages. Les pipettes doivent aussi être traitées de la même manière, et exposées aux UV pendant 30 minutes entre chaque préparation de bibliothèques.

1. Préparer la réaction suivante :

50µM hexamères aléatoires (random hexamers)	1µL
10mM dNTPs mix (10mM chacun)	1µL
Matrice RNA	11µL
TOTAL	12µL

NOTE : L'ARN viral d'origine d'un échantillon clinique doit être compris entre un Ct de 18 à 35. Si le Ct est entre 12 et 15, alors diluer l'échantillon d'un facteur 100 dans l'eau ; si le Ct est entre 15 et 18, alors diluer d'un facteur 10 dans l'eau. Cette dilution réduira le risque d'une inhibition de la PCR.

1. Mélanger doucement (éviter de vortexer) puis centrifuger brièvement le tube pour assurer un contact maximum avec le thermocycleur.

2. Incuber la réaction comme suit :

Dénaturation	65°C	5 mins
Hybridation des amorces	Glace	1 min

3. Ajouter ce qui suit à la matrice ADN hybridée :

Tampon (Buffer) SSIV	4µL
100mM DTT	1µL
RNaseOUT RNase Inhibitor	1µL
SSIV Reverse Transcriptase	1µL
TOTAL	20µL

4. Mélanger doucement (éviter de vortexer) puis centrifuger brièvement le tube pour assurer un contact maximum avec le thermocycleur.

5. Incuber la réaction comme suit :


Extension	42°C	90 mins
Inactivation	70°C	10 mins

6. L'ADNc est maintenant prêt pour la synthèse des amplicons.

Partie 2 : Préparation des amplicons d'Ebola

NOTE SUR LA PRÉPARATION DE LA HOTTE : Pour prévenir les contaminations croisées de l'échantillon ou d'autres réactifs, cette étape doit être effectuée dans la HOTTE DE MASTERMIX, qui est pré-stérilisée aux UV et traitée avec des lingettes MediPal, et les réactifs DNAway et RNaseZap. Nettoyer la hotte avec chacun des produits séquentiellement, avec 5 minutes de séchage entre passages. Les pipettes doivent aussi être traitées de la même manière, et exposées aux UV pendant 30 minutes entre chaque préparation de bibliothèques.

Dilution des amorces et préparation

1. Les amorces Ebola de ce protocole ont été préparées grâce à Primal Scheme  et génèrent des amplicons chevauchant de 400 nt. Les noms des amorces et leur dilution est listée dans le tableau suivant.
2. Les amorces doivent être préparées et aliquotées AVANT LE DÉPART dans une ENCEINTE PCR STÉRILE. Les amorces ou les réactifs de PCR ne doivent JAMAIS être placés près des matrices ou des amplicons avant usage.
3. Resuspendre les amorces lyophilisées à une concentration de 100µM chacun.
4. Générer les stocks de pool d'amorces en ajoutant 5µL de chaque paire d'amorces dans un tube Eppendorf de 1.5mL étiquetée "Pool 1, 100µM" ou "Pool 2, 100µM". Le volume total doit être de 505µL pour le Pool 1 et 530µL pour le Pool 2. Ceci est un stock de chaque pool d'amorces à une concentration de 10X.
5. Diluer d'un facteur 10 ce pool d'amorces dans de l'eau de grade moléculaire pour générer les stocks d'amorces à 10µM. Il est recommandé que plusieurs aliquots de chaque pool d'amorces soient préparés afin de tenir compte des risques de dégradation ou de contamination.

Nom	Séquence	Nom	Séquence	Mélange	[Stock]
Ebov-10-Pan_1_LEFT	TGTGTGCGAATAACTATGAG-GAAGA	Ebov-10-Pan_1_RIGHT	TTTCCAATGTTTACCCCAAGCTTT	1	100µM
		Ebov-10-Pan_1_RIGHT_alt1	TTTCCAATGCTTTACCCCAAGCTTT	1	100µM
		Ebov-10-Pan_1_RIGHT_alt2	TTTCCAATGTTTACCCCAAGTTTT	1	100µM
Ebov-10-Pan_2_LEFT	CAAGCAAGATTGAGAATTAACCT-TGGT	Ebov-10-Pan_2_RIGHT	ATCTCCCTGGTACGCATGATGA	2	100µM
Ebov-10-Pan_2_LEFT_alt1	CAAGCAAGATTGAGAATTAACCT-TGAT	Ebov-10-Pan_2_RIGHT_alt1	ATCTCCTTGGTACGCATGATGA	2	100µM
Ebov-10-Pan_3_LEFT	GGCCTTTGAAGCAGGTGTTGAT	Ebov-10-Pan_3_RIGHT	TCAGTCCTTGCTCTGCATGTAC	1	100µM
Ebov-10-Pan_4_LEFT	CCTTTGCAAGTCTATTCCTTCCGA	Ebov-10-Pan_4_RIGHT	CTGAGTGCAGCCTTAAAGGAGT	2	100µM
Ebov-10-Pan_4_LEFT_alt1	CCTTTGCAAGTCTATTCCTTCCGA			2	100µM
Ebov-10-Pan_5_LEFT	AGTTCGTCTCCATCCTCTTGCA	Ebov-10-Pan_5_RIGHT	CTGGAAGCTGATTCGTCTTTTTCT	1	100µM
Ebov-10-Pan_6_LEFT	GAGTCTCGCGAACTTGACCATC	Ebov-10-Pan_6_RIGHT	TCCTCGTCGCTCTGCTAGAT	2	100µM
Ebov-10-Pan_6_LEFT_alt1	GAATCTCGCGAACTTGACCATC	Ebov-10-Pan_6_RIGHT_alt1	TCCTCATCGTCCTCGCTAGAT	2	100µM
Ebov-10-Pan_7_LEFT	AGCTACGGCGAATACCAGAGTT	Ebov-10-Pan_7_RIGHT	GTCCCTGTCCTGCTCTTCATCA	1	100µM
		Ebov-10-Pan_7_RIGHT_alt1	GTCCCTGTCCTGTTCTTCATCA	1	100µM
		Ebov-10-Pan_7_RIGHT_alt2	GTCCCTGTCCTGTTCTTCATCG	1	100µM
Ebov-10-Pan_8_LEFT	TTAACGAAGAGGCAGACCCACT	Ebov-10-Pan_8_RIGHT	TTCTCTTCAAGGGAGTCTGGA	2	100µM
Ebov-10-Pan_8_LEFT_alt1	TCAACGAAGAGGCAGACCCACT	Ebov-10-Pan_8_RIGHT_alt1	TTCTCTTCAAGGGAGTCCGGA	2	100µM
Ebov-10-Pan_9_LEFT	GTGACAACACCCAGTCAGAACA	Ebov-10-Pan_9_RIGHT	TCTTCTGTTTTCGTTCCTTGACT	1	100µM
Ebov-10-Pan_9_LEFT_alt1	GTGACAACACCCAGCCAGAACA	Ebov-10-Pan_9_RIGHT_alt1	TCTTCTGTTTGC GTTCTTGACT	1	100µM
		Ebov-10-Pan_9_RIGHT_alt2	TCTTCTGTTTGC GTTCTTGACT	1	100µM
Ebov-10-Pan_10_LEFT	ACAATGGGATGATTCAACCGACA	Ebov-10-Pan_10_RIGHT	TCGAGTGCTAGAGAATTCAATTGACG	2	100µM
Ebov-10-Pan_10_LEFT_alt1	ATAATGGGATGATTTAACCGACA			2	100µM
Ebov-10-Pan_11_LEFT	ACCTACTAGCCTGCCAACATT	Ebov-10-Pan_11_RIGHT	AATTGGGTCCGTTTGGGTTTGA	1	100µM
Ebov-10-Pan_11_LEFT_alt1	ACCTACTAGCCTACCCAACATT	Ebov-10-Pan_11_RIGHT_alt1	AATTGGATCCGTTTGGGTTTGA	1	100µM
Ebov-10-Pan_12_LEFT	CCCAAATGCAACAAACGAAGCC	Ebov-10-Pan_12_RIGHT	TCAATCTTACCCGAATCGCAC	2	100µM
Ebov-10-Pan_12_LEFT_alt1	CCCAAATGCAACAAACAAAGCC	Ebov-10-Pan_12_RIGHT_alt1	TCAATCTTACCCGAATTGCAC	2	100µM
Ebov-10-Pan_13_LEFT	TATTGGGCCGAACATGGTCAAC	Ebov-10-Pan_13_RIGHT	TGACAGGTGGAGCAGCATCTTG	1	100µM
Ebov-10-Pan_13_LEFT_alt1	TATTGGGCTGAACATGGTCAAC			1	100µM
Ebov-10-Pan_14_LEFT	CATTCATGCTGAGTTCCAGGCC	Ebov-10-Pan_14_RIGHT	GCGAGATATGAACAATTTTATCTTG-GTCG	2	100µM
		Ebov-10-Pan_14_RIGHT_alt1	GCGAGATAAGGACAATTTTATCTTG-GTCG	2	100µM
		Ebov-10-Pan_14_RIGHT_alt2	GCGAGATAAGAACAATTTTATCTTG-GTCG	2	100µM
Ebov-10-Pan_15_LEFT	TGAGTATCAGCCCTGGATAATA-TAAGTCA	Ebov-10-Pan_15_RIGHT	TCGATGGAGTGTCCTTATTGAC	1	100µM
Ebov-10-Pan_15_LEFT_alt1	TGAGTATCAGCCCTAGATAATA-TAAGTCA	Ebov-10-Pan_15_RIGHT_alt1	TCGATGGAGTGTCCTTATTGAC	1	100µM

Nom	Séquence	Nom	Séquence	Mélange	[Stock]
Ebov-10-Pan_16_LEFT	GCAACAGCAATACAGGCTTCCT	Ebov-10-Pan_16_RIGHT	GAAAGCCTGGTTTCCAATTCGC	2	100µM
Ebov-10-Pan_16_LEFT_alt1	GCAACAACAATACAGGCTTCCT	Ebov-10-Pan_16_RIGHT_alt1	GAAGGCCTGGTTTCCAATTCGC	2	100µM
Ebov-10-Pan_17_LEFT	CCACTTGTGAGAGTCAATCGGC	Ebov-10-Pan_17_RIGHT	GTTTCTGGCACTTCGATTCCCA	1	100µM
Ebov-10-Pan_18_LEFT	AAAATCCAAGCAATAAT-GACTTCACTCC	Ebov-10-Pan_17_RIGHT_alt1	GTTTCTGGCACTTCGATACCCA	1	100µM
		Ebov-10-Pan_18_RIGHT	TTGATCAATTAAGT-GTCTCCTCTAATGG	2	100µM
		Ebov-10-Pan_18_RIGHT_alt1	TCGAT-CAATTTAAAGTATCTCCTAATGG	2	100µM
		Ebov-10-Pan_18_RIGHT_alt2	TTGATCAAT-TAAAAGTATCTCCTAATAG	2	100µM
Ebov-10-Pan_19_LEFT	AGATCCAGTTTTATAGAATCTTCT-CAGGGA	Ebov-10-Pan_19_RIGHT	AGAAGGGCAATGTCTGTACTTGG	1	100µM
Ebov-10-Pan_19_LEFT_alt1	AGATCCAGTTTTACAGAATCTTCT-CAGGGA	Ebov-10-Pan_19_RIGHT_alt1	AGAAGGGCGATGTCTGTGCTTGG	1	100µM
Ebov-10-Pan_20_LEFT	AGCCAGTGTGACTTGATTGGA	Ebov-10-Pan_20_RIGHT	AGTTTGTGACATCACTAACCTGT	2	100µM
Ebov-10-Pan_21_LEFT	AGAACATTTTCCATCCCCTTGGA	Ebov-10-Pan_20_RIGHT_alt1	AGTTTGTGACATCACTAATTGT	2	100µM
		Ebov-10-Pan_21_RIGHT	AAGCACCTCTTTATGGAAGGC	1	100µM
		Ebov-10-Pan_21_RIGHT_alt1	AAGCACCTCTTTGTGGAAGGC	1	100µM
Ebov-10-Pan_22_LEFT	TGCCGGTATGTGCACAAAGTAT	Ebov-10-Pan_22_RIGHT	ATATATTGTCTATTGAGCTGGAGCA	2	100µM
Ebov-10-Pan_23_LEFT	CGAGGTTGACAATTTGACCTACGT	Ebov-10-Pan_23_RIGHT	GCAAGGGTTGTTAGATGCGACA	1	100µM
		Ebov-10-Pan_23_RIGHT_alt1	GCAAGGGTTGTGAGATGCGACA	1	100µM
Ebov-10-Pan_24_LEFT	TGCAATGGTTCAAGTGCACAGT	Ebov-10-Pan_24_RIGHT	CTGGCACTCTCTCTCCGGTAT	2	100µM
Ebov-10-Pan_24_LEFT_alt1	TGCAATGGTTCAAGTGCACAAT			2	100µM
Ebov-10-Pan_25_LEFT	ACCACAACAAGTCCCCAAAACC	Ebov-10-Pan_25_RIGHT	TAGCTCAGTTGTGGCTCTCAGG	1	100µM
		Ebov-10-Pan_25_RIGHT_alt1	TAGCTCGGTTGTGGCTCTCAGG	1	100µM
Ebov-10-Pan_26_LEFT	ATCTGTGGGTTGAGACAGCTGG	Ebov-10-Pan_26_RIGHT	GCTTTTCCATGAAGCAATCTGAAGA	2	100µM
Ebov-10-Pan_26_LEFT_alt1	ATCTGTGGATTGAGGAGCTGG	Ebov-10-Pan_26_RIGHT_alt1	GCTTTGCCATGAAGCAATCTGAAGA	2	100µM
Ebov-10-Pan_26_LEFT_alt2	ATCTGTGGGTTGAGGAGCTGG			2	100µM
Ebov-10-Pan_27_LEFT	TGGAGTTACAGGCGTTATAAT-TGCA	Ebov-10-Pan_27_RIGHT	AAAGGCTCTTTCCCTTGCTACT	1	100µM
Ebov-10-Pan_28_LEFT	TCATCCTTGATTCTACAATCAT-GACAGT	Ebov-10-Pan_28_RIGHT	AGGTGCTGGAGGAAGTGAATG	2	100µM
Ebov-10-Pan_28_LEFT_alt1	TCATCCTTGATTCTACAAT-CATAACAGT			2	100µM
Ebov-10-Pan_29_LEFT	GAGTACCGTCAATCAAGGAGCG	Ebov-10-Pan_29_RIGHT	CACAGCACATAGAGTCAACAATGC	1	100µM
Ebov-10-Pan_30_LEFT	GATCAAGACGGCAGAACTGG	Ebov-10-Pan_30_RIGHT	ATCAGACCATGAGCATGTCCCC	2	100µM
Ebov-10-Pan_31_LEFT	CTGCTGTCGTTGTTTCAGGGTT	Ebov-10-Pan_31_RIGHT	ATGGGATGGATCGTTGCTACCT	1	100µM
		Ebov-10-Pan_31_RIGHT_alt1	ATGGGATGGATCGTTGCTGCCT	1	100µM
		Ebov-10-Pan_31_RIGHT_alt2	ATGAGATGGATCGTTGCTACCT	1	100µM
Ebov-10-Pan_32_LEFT	GCCAAGCATACCTCTTGACAA	Ebov-10-Pan_32_RIGHT	TGGACTACCCTGAAATAGTACTTTGC	2	100µM

Nom	Séquence	Nom	Séquence	Mélange	[Stock]
Ebov-10- Pan_33_LEFT	TGCGGAGGTCT- GATAAGAATAAACCC	Ebov-10- Pan_33_RIGHT	TTCAACCTTGAAACCTTGCCT	1	100µM
		Ebov-10- Pan_33_RIGHT_alt1	TTCAACTTTGAAACCTTGCCT	1	100µM
Ebov-10- Pan_34_LEFT	GCTGAAAAGAAGCT- TACCTACAACG	Ebov-10- Pan_34_RIGHT	TCCTTGTCATTGACCATGCAGG	2	100µM
Ebov-10- Pan_34_LEFT_alt1	GTTGAAAAAAG- GCCTACCTACAACG			2	100µM
Ebov-10- Pan_34_LEFT_alt2	GCTGAAAAGAAGC- CCACCTACAACG			2	100µM
Ebov-10- Pan_35_LEFT	GTGACTCACAAGGAATGGCCC	Ebov-10- Pan_35_RIGHT	ACAATCCGTTGTAGTTCACGACA	1	100µM
		Ebov-10- Pan_35_RIGHT_alt1	ACAACCCGTTGTAGTTCACGACA	1	100µM
Ebov-10- Pan_36_LEFT	TGCTGTCGTTGATTCGATCCAA	Ebov-10- Pan_36_RIGHT	AGCAGAGATGTCAAGATAACTAT- TGAGT	2	100µM
Ebov-10- Pan_37_LEFT	ACACGAATGCAAAGTTTGATTCT- TGA	Ebov-10- Pan_37_RIGHT	TGAAACCTAACACATGTGACCTGC	1	100µM
		Ebov-10- Pan_37_RIGHT_alt1	TGAAACCTAACACACGTGACCTGC	1	100µM
Ebov-10- Pan_38_LEFT	CCCTCAAACAA- GAGATTCCAAGACA	Ebov-10- Pan_38_RIGHT	ACAGTTGCGTAGTTGCGGATTA	2	100µM
Ebov-10- Pan_38_LEFT_alt1	CCCTCAAATAA- GAGATTCCAAGACA			2	100µM
Ebov-10- Pan_38_LEFT_alt2	TCCTCAAATAA- GAGATTCCAAGACA			2	100µM
Ebov-10- Pan_39_LEFT	ACCTAGTCACTAGAGCTTGCGG	Ebov-10- Pan_39_RIGHT	ACATTTGATGTAAAAATTCATTGC- CTG	1	100µM
Ebov-10- Pan_40_LEFT	GTGGGTGCTCAAGAAGACTGTG	Ebov-10- Pan_40_RIGHT	TGAGATTAGAGTTGTGT- TGAATCGACA	2	100µM
Ebov-10- Pan_40_LEFT_alt1	GTGGGTGCTCAAGAGGACTGTG	Ebov-10- Pan_40_RIGHT_alt1	TGAGATTAGAGTCGTGT- TGAATCGACA	2	100µM
Ebov-10- Pan_41_LEFT	AAGAAGCGGTTCAAGGGCATAAC	Ebov-10- Pan_41_RIGHT	CTATGGAATTCACGGATCTTTTGAGC	1	100µM
Ebov-10- Pan_41_LEFT_alt1	AAGAAGCAGTTCAAGGGCATAAC	Ebov-10- Pan_41_RIGHT_alt1	CTATGGAATTCACGGATCTTTTGATC	1	100µM
Ebov-10- Pan_42_LEFT	TGCATTTAGCTGTAAATCACAC- CCT	Ebov-10- Pan_42_RIGHT	AATCATTGGCAACGGAGGGAAT	2	100µM
		Ebov-10- Pan_42_RIGHT_alt1	AATCATTGGCAACGGGGGGAAT	2	100µM
Ebov-10- Pan_43_LEFT	GTCAAGGATCTTGGTACAGTGT- TACT	Ebov-10- Pan_43_RIGHT	TGAGAAAGAAAAGTTCCGATATTGT- GGT	1	100µM
Ebov-10- Pan_43_LEFT_alt1	GCCAAGGGTCTTGGTACAGTGT- TACT	Ebov-10- Pan_43_RIGHT_alt1	TGAGAAAGAAAAGTTCCGATATTGT- GGT	1	100µM
Ebov-10- Pan_43_LEFT_alt2	GTCAAGGGTCTTGGTACAGTGT- TACT	Ebov-10- Pan_43_RIGHT_alt2	TGAGAAAGAAAAGTTCCGATATTGT- GGT	1	100µM
Ebov-10- Pan_44_LEFT	TTGAGAAT- GTTCTTTCTACGCACA	Ebov-10- Pan_44_RIGHT	ACGGTTGCAATATTCTATAAAAGGT- GC	2	100µM
Ebov-10- Pan_44_LEFT_alt1	TTGAGAAT- GTTCTTTCTACGCGCA	Ebov-10- Pan_44_RIGHT_alt1	ACGGTTGCAATATTCTATAAAAGGT- GC	2	100µM
		Ebov-10- Pan_44_RIGHT_alt2	ACGGTTACAATATTCTATAAAAGGT- GC	2	100µM
Ebov-10- Pan_45_LEFT	CCACAGTTAGAGGGAGTAGCTTTG	Ebov-10- Pan_45_RIGHT	GCTCGTCTGCGTCAGTCTCTAA	1	100µM
Ebov-10- Pan_45_LEFT_alt1	CCACAGTTAGAGGGAGTAGTTTTG			1	100µM
Ebov-10- Pan_46_LEFT	AAGTTACGCTCAGCTGTGATGG	Ebov-10- Pan_46_RIGHT	ATGGAAAGCTGCGGTTATCCTG	2	100µM
Ebov-10- Pan_47_LEFT	TAGGCACTGCTTTTGAGCGATC	Ebov-10- Pan_47_RIGHT	CACAAAGTCAATGGCAGTGCAG	1	100µM
Ebov-10- Pan_47_LEFT_alt1	TAGGCACCGCTTTTGAGCGGTC			1	100µM
Ebov-10- Pan_47_LEFT_alt2	TAGGCACTGCTTTTGAACGATC			1	100µM

Nom	Séquence	Nom	Séquence	Mélange	[Stock]
Ebov-10-Pan_48_LEFT	TCTCCGAATGATTGAGATGGAT-GATT	Ebov-10-Pan_48_RIGHT	CTCAGTCTGTCCAAAACCGGTG	2	100µM
Ebov-10-Pan_48_LEFT_alt1	TCTCCGAATGATTGGGATGGAT-GATT			2	100µM
Ebov-10-Pan_49_LEFT	GATATCTTTTCACGCACGCCGA	Ebov-10-Pan_49_RIGHT	CCACCTGGTTGCTTTCATTTG	1	100µM
Ebov-10-Pan_49_LEFT_alt1	GATATCTTTTCACGCACGCCCA	Ebov-10-Pan_49_RIGHT_alt1	CCACCAGGTTGCTTTCATTTG	1	100µM
Ebov-10-Pan_50_LEFT	TCAAAGTGTTTTGGCTGAAACCTT	Ebov-10-Pan_50_RIGHT	TCCTGAGTAATGTGAAGGGGTCA	2	100µM
Ebov-10-Pan_50_LEFT_alt1	TCAAAGTGTTTGGCTGAAACCTT	Ebov-10-Pan_50_RIGHT_alt1	TCCTGAGTAATGTGAAGGAGTCA	2	100µM
Ebov-10-Pan_51_LEFT	AACAGTGACTTGCTAATAAAAC-CATTTTTG	Ebov-10-Pan_51_RIGHT	AAATACTGAGCTGGTACTTCCCG	1	100µM
Ebov-10-Pan_51_LEFT_alt1	AACAGTGACTTGCTAATAAAGC-CATTTTTG			1	100µM
Ebov-10-Pan_51_LEFT_alt2	AACAGTGATTGCTAATAAAAC-CATTTTTG			1	100µM
Ebov-10-Pan_52_LEFT	AATCGTGCTCACCTTCATCTAACT	Ebov-10-Pan_52_RIGHT	CCCCAACTGTACAGAAGTCCTATCT	2	100µM
Ebov-10-Pan_53_LEFT	ACAGACCCAATTAGCAGTGGAGA	Ebov-10-Pan_53_RIGHT	ACAATTGTTCCGCGATTAAT-TATCCAT	1	100µM
Ebov-10-Pan_53_LEFT_alt1	ACAGACCCAATTAGCAGCGGAGA	Ebov-10-Pan_53_RIGHT_alt1	ACAATTGTTCCGCGATTAAT-TATCCACT	1	100µM
Ebov-10-Pan_54_LEFT	TCTCAGATGCGGCCAGGTTATT	Ebov-10-Pan_54_RIGHT	TGACCATCACTGTTGTTTGTGCT	2	100µM
Ebov-10-Pan_54_LEFT_alt1	TCTCAGATGCGGCCAGATTATT			2	100µM
Ebov-10-Pan_55_LEFT	TGGAGGAGCAGACACAGAAACA	Ebov-10-Pan_55_RIGHT	ATGACGTTAATTGGCGTGTCCT	1	100µM
Ebov-10-Pan_55_LEFT_alt1	TGGAGGAGCAGGCACAGAAACA	Ebov-10-Pan_55_RIGHT_alt1	ATGACGTC AATTGGCGTGTCCT	1	100µM
Ebov-10-Pan_55_LEFT_alt2	TGGAGAAGCAGGCACAGAAACA	Ebov-10-Pan_55_RIGHT_alt2	ATGACGTTAATTGGCGTGTCCT	1	100µM
Ebov-10-Pan_56_LEFT	CTCACACCGTCTAGTCCTACCT	Ebov-10-Pan_56_RIGHT	TTTGACATAACAGGTAGAAGCATCCT	2	100µM
Ebov-10-Pan_56_LEFT_alt1	CTCGCACCGTCTAGTCCTACCT			2	100µM
Ebov-10-Pan_56_LEFT_alt2	CTCACATCGTCTAGTCCTACCT			2	100µM
Ebov-10-Pan_57_LEFT	ACACGCTAGCTACTGAGTCCAG	Ebov-10-Pan_57_RIGHT	ATTGGCTTAATTAAATAACCAAGTG-GCA	1	100µM
Ebov-10-Pan_58_LEFT	TGAAAGCAGTGGTCCTTAAAGTCT	Ebov-10-Pan_58_RIGHT	TGCTCTAAGATGTGCTAAGTGCTG	2	100µM
		Ebov-10-Pan_58_RIGHT_alt1	TGCTCTAAGATGTGCCAAGTGCTG	2	100µM
Ebov-10-Pan_59_LEFT	CGTCGATTCAAAAAGAGGTCCACT	Ebov-10-Pan_59_RIGHT	TCAGAAGCCCTGTCAGCCTTTC	1	100µM
Ebov-10-Pan_60_LEFT	AGATTGCAATTGT - GAAGAACGTTTCT	Ebov-10-Pan_60_RIGHT	AGAGTGACAGAGTTTATTATGTTGCGT	2	100µM
Ebov-10-Pan_61_LEFT	TCACAATGCAGCATGTGTGACA	Ebov-10-Pan_61_RIGHT	AGGTATTTCTGATTTTACAGTCCT-GCC	1	100µM
		Ebov-10-Pan_61_RIGHT_alt1	AGGTATTTATGATTTTACAGTCCT-GCC	1	100µM
		Ebov-10-Pan_61_RIGHT_alt2	AGGTATTTCTGATTTTACAGTCAT-GCC	1	100µM
Ebov-10-Pan_62_LEFT	CCTGTCAGATGGAATAGT - GTTTTGGT	Ebov-10-Pan_62_RIGHT	AATTTTTGTGTGCGACCATTTTTCC	2	100µM

NOTE : Les amorces doivent être utilisées à une concentration finale de 0.015µM par amorce. Ainsi, Pool 1 contient 101 amorces : il est donc nécessaire d'ajouter 3.8µL du Pool 1 à 10µM pour chaque réaction de 25µL. Le pool 2 contient 106 amorces : il est donc nécessaire d'ajouter 4.0µL du Pool 2 à 10µM pour chaque réaction de 25µL. Pour d'autres approches, ajuster le volume de manière appropriée.

1. Préparer les réactions de PCR comme suit dans des tubes PCR à paroi fine de 0.5 mL ou des barrettes :

Réactif	Pool 1	Pool 2
NEB Q5 Polymerase 2X MasterMix	12.5µL	12.5µL
Pool d'amorces 1 ou 2 (10µM)	3.8µL	4.0µL
Eau	6.2µL	6.0µL
TOTAL	22.5µL	22.5µL

NOTE : Cette étape doit être faite dans la HOTTE MASTERMIX ; l'ADNc ne doit jamais être emmenée près de cette hotte mastermix.

1. Dans la HOTTE MATRICE ajouter 2.5µL d'ADNc à chaque réaction Pool1 et Pool2 et bien mélanger.
2. Centrifuger brièvement les tubes pour enlever le contenu des couvercles.
3. Préparer les conditions de PCR comme suit :

Étape	Temperature	Temps	Cycles
Activation par la chaleur	98°C	30 secondes	1
Dénaturation	98°C	15 secondes	25-35
Hybridation	65°C	300 secondes	25-35
Maintien	4°C	Indéfini	1

NOTE : Le nombre de cycle doit être de 25 pour des Ct compris entre 18 et 21 jusqu'à un maximum de 35 cycles pour Ct 35.

1. Purifier les amplicons en utilisant le protocole suivant dans la HOTTE MATRICE :

- a. Combiner entièrement le contenu des réactions de PCR "Pool1" et "Pool2" pour chaque échantillon biologique dans un seul tube Eppendorf 1.5mL.
- b. Mélanger délicatement, éviter de vortexer.
- c. S'assurer que les billes Aline sont bien resuspendues en mélangeant vigoureusement avant d'ajouter à l'échantillon. Le mélange doit être d'une couleur brune homogène.
- d. Ajouter un volume équivalent de billes Aline dans le tube et mélanger délicatement soit en pipettant ou en tapotant avec le doigt. Le volume total doit d'environ 50µL, donc ajouter 50µL de billes.
- e. Centrifuger brièvement les tubes pour enlever les billes du couvercle ou des parois du tube.
- f. Incuber 5 mins à température ambiante.
- g. Placer sur un support magnétique et incuber 2 minutes ou jusqu'à ce que les billes aient formé un culot contre l'aimant et que la solution soit complètement transparente.
- h. Enlever et jeter avec précaution la solution, en faisant attention de ne pas toucher le culot de billes.
- i. Ajouter 200µL d'éthanol 70% à température ambiante au culot.

- j. Enlever et jeter avec précaution l'éthanol, en faisant attention de ne pas toucher le culot de billes.
- k. Répéter les étapes 9 à 10 pour laver à nouveau le culot.
- l. Centrifuger brièvement le culot et enlever avec précaution autant d'éthanol que possible en utilisant un cône de 10µL.
- m. Laisser le culot sécher 1 minute, en éviter de trop le dessécher (si le culot commencer à craqueler, alors il est trop sec).
- n. Resuspendre le culot dans 30µL d'eau, et incubé pour 2 mins.
- o. Placer sur un support magnétique et AVEC PRÉCAUTION enlever l'eau et la transférer dans un tube Eppendorf de 1.5mL propre. ASSUREZ-VOUS qu'aucune bille ne soit transférée dans ce tube. Dans certains cas, une brève centrifugation peut être utile pour culotter les billes résiduelles.
- p. Quantifier les mélanges d'amplicons en utilisant le protocole ONE dsDNA du fluoromètre Quantus

Partie 3 : Quantification Quantus des mélanges d'amplicons

1. Préparer le nombre requis de tubes 0.5mL.

NOTE : N'utiliser que des tubes PCR à paroi fine et transparente de 0.5mL.

1. Annoter le couvercle des tubes. Ne pas annoter les côtés du tube, cela pourrait interférer avec la lecture de l'échantillon.
2. Ajouter 199µL de la solution "ONE dsDNA dye" à chaque tube.
3. Ajouter 1µL de chaque échantillon au tube correspondant.

NOTE : Utiliser une pipette P2 pour plus de précision.

1. Mélanger chaque échantillon vigoureusement en vortexant pendant 3-5 secondes.
2. Laisser les tubes incuber à température ambiante pendant 2 minutes avant de continuer.
3. Sur l'écran d'accueil du fluoromètre Quantus, sélectionner **Protocol**, puis **ONE DNA** comme type d'analyse.

NOTE : Si vous avez déjà effectué une calibration pour l'analyse sélectionnée, vous pouvez continuer, il n'y a pas besoin de faire des calibrations répétées lors de l'utilisation de la solution ONE DNA pré-diluée. **Si vous souhaitez utiliser une calibration précédente, continuez à l'étape 11.** Dans le cas contraire, continuez avec l'étape 8.

1. Ajouter 200µL de solution "ONE dsDNA Dye" à deux tubes de 0.5mL.
2. Ajouter 1µL d'ADN Lambda standard à 400 ng/µL fourni avec le kit dans l'un des deux tubes. Ces deux tubes sont respectivement le blanc et le standard requis pour effectuer la procédure de calibration à un point.
3. Sélectionner **Calibrate**, puis **ONE DNA** et placer le blanc dans le lecteur puis sélectionner **Read Blank**. Ensuite placer le standard dans le lecteur et sélectionner **Read Std**.
4. Sur l'écran d'accueil, naviguer sur **Sample Volume** et régler sur 1µL puis sur **Units** et régler sur ng/µL.
5. Placer le premier échantillon dans le lecteur et fermer le couvercle. La concentration est lue automatiquement lors de sa fermeture.
6. Répéter l'étape 12 jusqu'à ce que tous les échantillons aient été lus.
7. La valeur affichée à l'écran est la concentration d'ADN double-brin. **Consigner avec soin tous les résultats** dans un tableur ou un cahier de laboratoire.

Partie 4: Barcoding et ligation des adaptateurs: protocole en tube unique

NOTE: Ceci est un protocole en tube unique pour la préparation de bibliothèques avec ligation de barcode natifs. Nous n'avons observé aucune réduction de performance par rapport aux bibliothèques standards, et peut même être plus rapide si l'on utilise le module Ultra II® ligation, qui est compatible avec le module Ultra II® end repair/dA-tailing en retirant une étape de purification. Si vous avez le temps, on recommande de doubler les temps d'incubation en bleue. Si vous êtes pressés, les temps indiqués en rouge sont un bon compromis entre vitesse et efficacité.

1. Préparer la réaction de préparation d'extrémité (End Prep) suivante pour chaque échantillon biologique :

ADN (20 ng)	16.7µL
Ultra II End Prep Reaction Buffer	2.3µL
Ultra II End Prep Enzyme Mix	1µL
Total	20µL

NOTE: La quantité d'amplicons peut varier de 10-50ng, mais pas au-delà: le molarité de l'ADN serait trop élevée pour un barcoding efficace. Il faut avoir 6 échantillons par chaque bibliothèque barcode natif pour avoir suffisamment de matériel à la fin.

1. Incuber à température ambiante pendant 20 mins puis à 65°C pendant 10 mins.
2. Placer sur glace pendant 30 secondes.
3. Ajouter directement aux réactions précédentes :

NBXX barcode	2.5µL
Ultra II Ligation Master Mix	22.5µL
Ligation Enhancer	0.7µL
Total	45.7µL

NOTE: N'utiliser qu'UN SEUL barcode par échantillon biologique.

1. Incuber à température ambiante pendant 30 mins, 70°C pendant 10 mins puis placer sur glace.

NOTE: Cette étape vise à inactiver l'ADN ligase pour éviter des croisements entre barcodes.

1. Mélanger tous les fragments barcodés ensemble dans un tube Eppendorf 1.5mL propre.
2. Ajouter 45.7µL de billes Aline par échantillon.
3. Incuber 5 mins.
4. Placer sur un support magnétique et incuber 2 minutes ou jusqu'à transparence.
5. Enlever la solution.
6. Ajouter 200µL d'éthanol à 70%, toujours sur le support magnétique.
7. Enlever et jeter l'éthanol sans toucher le culot.
8. Répéter les étapes 11 et 12.

9. Centrifuger brièvement et enlever l'éthanol 70% résiduel puis sécher à l'air libre pendant 1 min.
10. Resuspendre dans 31µL de tampon EB.
11. Incuber hors du support magnétique pendant 2 minutes.
12. Replacer sur le support magnétique.
13. Attendre que la solution devienne transparente puis transférer la solution dans un tube Eppendorf propre de 1.5mL.
14. Retirer 1µL et mesurer la concentration par Quantus comme décrit au-dessus.
15. Préparer la réaction de ligation d'adaptateur suivante :

Mélanges purifiés de pool d'amplicons (~60ng)	30µL
NEBNext Quick Ligation Reaction Buffer (5X)	10µL
AMII adapter mix	5µL
Quick T4 DNA Ligase	5µL
Volume total	50µL
16. Incuber à température ambiante pendant 30 mins.
17. Ajouter 50µL de billes Aline.
18. Incuber pendant 5 mins.
19. Placer sur un support magnétique jusqu'à transparence.
20. Retirer le surnageant.
21. Ajouter 200µL de SFB et resuspendre en tapotant avec le doigt.

ATTENTION : Ne pas utiliser d'éthanol à 80%.

1. Placer sur le support magnétique jusqu'à transparence.
2. Retirer le surnageant.
3. Répéter le lavage au SFB.
4. Centrifuger brièvement et retirer le SFB résiduel.
5. Ajouter 15µL de tampon EB et resuspendre en tapotant avec le doigt.
6. Incuber à température ambiante pour 2 mins.
7. Placer sur le support magnétique.
8. Transférer avec précaution dans un tube Eppendorf 1.5mL propre.
9. Retirer 1µL et mesurer la concentration avec le fluoromètre Quantus comme décrit au-dessus.

NOTE : Les librairies peuvent être stockées à 4°C si nécessaire, mais pour un meilleur résultat, il est préférable de continuer immédiatement avec le séquençage.

Partie 5 : Amorçage et chargement sur la flowcell SpotON

1. Dégeler les réactifs suivants à température ambiante avant de les placer sur glace:
 - Sequencing buffer (SQB) [tampon séquençage]
 - Loading beads (LB) [les billes pour le chargement de la flowcell]
 - Flush buffer (FLB) [tampon pour purger a flowcell]
 - Flush tether (FLT)
2. Ajouter 30µL de FLT au tube de FLB et bien mélanger.
3. Retourner le couvercle de la flowcell et faire glisser le couvercle du port d'amorçage au sens des aiguilles d'une montre pour que le port d'amorçage devienne visible.

ATTENTION : Cette étape doit être faite avec précaution. La matrice des pores doit être constamment couverte par un tampon. Retirer plus que 20-30µL risque d'endommager les pores.

1. Après avoir ouvert le port d'amorçage, vérifier s'il n'y a pas de petites bulles d'air sous le couvercle. Aspirer un petit volume pour enlever toute bulle (quelques µLs):
 - Régler une pipette P1000 sur 200µL
 - Insérer le cône dans le port d'amorçage
 - Tourner la molette de la pipette jusqu'à ce que le cadran indique 220-230µL, ou jusqu'à ce que vous voyez un petit volume de tampon entrer dans le cône.
2. Placer 800µL du FLB+FLT dans la flowcell par le port d'amorçage, utilisant la méthode décrite à l'étape 5. Éviter d'introduire des bulles d'air.
3. Attendre 5 minutes.
4. Dans un nouveau tube Eppendorf propre, préparer la dilution de la librairie pour le séquençage :

Réactif	Volume
SQB	37.5µL
LB	25.5µL
Librairie (~30ng)	12µL
Total	75µL

5. Soulever doucement le couvercle du port d'échantillon SpotON pour rendre le port accessible.
6. Placer 200µL du mix d'amorçage dans le port d'amorçage (**PAS** le port d'échantillon SpotON), en évitant l'introduction de bulles d'air.
7. Mélanger doucement la librairie préparée en pipettant de haut et en bas avant de charger la flowcell.
8. Au goutte à goutte, ajouter 75µL de la librairie préparée sur la flowcell par le port d'échantillon SpotON. S'assurer que chaque goutte est bien aspirée dans le port avant ajouter la goutte suivante.
9. Replacer doucement le couvercle du port d'échantillon SpotON, en s'assurant que le bouchon entre bien dans le port SpotON. Fermer le port d'amorçage et replacer le couvercle du MinION.
10. Double-cliquer sur l'icone MinKNOW sur le bureau pour ouvrir l'interface graphique MinKNOW.
11. Si votre MinION été déconnectée de l'ordinateur, le re-connecter maintenant.
12. Choisir le type de flowcell dans la boîte de sélection :
 - **FLO-MIN106** : R9.4.1 flowcell
13. Marquer la flowcell comme **Selected**.
14. Cliquer sur le bouton **New Experiment** en bas à gauche de l'interface graphique.
15. Dans l'écran popup, sélectionner les paramètres pour votre expérience dans les onglets individuels :

- **Experiment**

Nommer le run dans le champ expérience, laisser le champ de l'échantillon vide.

- **Kit**

Sélectionner LSK109 comme il n'y a pas d'option pour le kit de barcoding natif (NBD104)

- **Run Options**

Définir la durée du run de séquençage, d'ordinaire 1-2 heures.

- **Basecalling**

Laisser "basecalling" allumé et vérifier que le "HAC" (high accuracy model) est sélectionné.

- **Output**

Le nombre de fichiers que MinKNOW écrira dans un seul dossier. Par défaut réglé sur 4000.

16. Cliquer sur **Start run**.

17. Laisser le script se dérouler jusqu'au bout.

18. La page **Experiment** du MinKNOW indiquera la progression du script ; ceci est accessible par l'onglet **Experiment** qui apparaîtra en haut à droite de l'écran.

19. Surveillez le panneau **Message** du côté droit pour les erreurs.