	Séquençage MinION – Protocole ARTIC NetWork		
	Support d'Enregistrement	Version n° 1 du (10/06/2020)	Codification
Emetteur : instance, direction, groupe travail		Validation : direction, instance...	
Destinataire : unités, fonctions concernées...			

Date :

Manipulateur :

1 Echantillons et extraction Emag

→ 200µL d'échantillon dans un tube de lyse contenant 2mL de tampon de lyse

2 RT

Réactifs	X 1 (µL)	X ... (µL)
Random Hexamer (60µM)	1	
dNTPs (10mM)	1	
Total	2	
ARN	11	-

→ Programme ARTIC-RT-1

65°C – 5 minutes

→ Incuber dans la glace minimum 1 minute

Réactifs	X 1 (µL)	X ... (µL)
SuperScript IV Buffer (5X)	4	
dTT (100mM)	1	
RNaseOUT RNase Inhibitor	1	
SuperScript IV Reverse Transcriptase	1	
Total	7	-

→ Ajouter 7µL dans chaque tube

→ Programme ARTIC-RT-2

23°C – 10 minutes


55°C – 20 minutes

80°C – 10 minutes

4°C – Hold

3 PCR et clean-up

Réactifs	X 1 (µL)	X ... (µL)
Eau nuclease free	13,05	
Q5 Reaction Buffer (5X)	5	
dNTPs (10mM)	0,5	
Primer pool A ou B (10µM)	3,7	
Q5 Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase	0,25	
Total	22,5	
cDNA	2,5	-

	Séquençage MinION – Protocole ARTIC NetWork		
	Support d'Enregistrement	Version n° 1 du (10/06/2020)	Codification

→ Programme ARTIC-PCR

98°C – 30 secondes
 98°C – 15 secondes
 65°C – 5 minutes
 4°C – Hold

x 35

→ Mélanger les produits de PCR pool A et pool B (total 50µL)

- 50µL de billes (0.5X)
- 2 lavages avec 200µL d'éthanol 80%
- Elution dans 17µL (prélever 15µL)
- Quantifier 1µL avec le kit Qubit BR

STOPPING POINT -20°C

4 End prep

Dilutions des ADNc à 50ng

Réactifs	X 1 (µL)	X ... (µL)
cDNA (50ng)	x	
H2O nuclease free	12,5 - x	
Ultra II End-prep reaction buffer	1,75	
Ultra II End-prep enzyme mix	0,75	
Total	15	-

→ Programme ARTIC-END-PREP

5 minutes – 20°C
 5 minutes – 65°C


5 Native barcode ligation et clean-up

Réactifs	X 1 (µL)	X ... (µL)
H2O nuclease free	5,5	
End prepped DNA	1,5	
Native barcode	2,5	
NEBNext Ultra II Ligation master mix	10	
NEBNext Ligation enhancer	0,5	
Total	20	-

→ Programme ARTIC-BARCODING

20 minutes – 20°C
 10 minutes – 65°C

- Pooler tous les échantillons
- 0,4X de billes (pour 24 échantillons 480µL soit 192µL de billes)
- Incuber 10 minutes sous agitation
- 2 lavages avec 700µL SFB avec remise en suspension des billes
- 1 lavage avec 100µL d'éthanol 80%
- Laisser sécher 30 sec
- Elution dans 36µL (prélever 35µL)
- Quantifier 1µL avec le kit Qubit HS (idéal 2ng/µL)

	Séquençage MinION – Protocole ARTIC NetWork		
	Support d'Enregistrement	Version n° 1 du (10/06/2020)	Codification

6 Adapter ligation et clean-up

Réactifs	X 1 (μL)	X ... (μL)
Pool	x (30-50ng)	
H2O nuclease free	30-x	
Adapter Mix II (AMII)	5	
NEBNext Quick ligation Reaction buffer (5X)	10	
Quick T4 DNA ligase	5	
Total	50	-

→ Incubation 20 minute à température ambiante

- Ajouter 20μL de billes (0.4X)
- Incuber 10 minutes sous agitation
- 2 lavages avec 125μL SFB avec remise en suspension des billes
- Elution dans 16μL EB (prélever 15μL)
- Quantifier 1μL avec le kit Qubit HS

7 Chargement de la FlowCell

- Contrôler la FlowCell – nb de pores actifs :
- Ouvrir le priming port – retirer env. 30μL avec une P1000
- Préparer le priming mix : 30μL FLT dans un tube FB
- Charger env. 800μL de priming mix dans le priming port (ATTENTION AU BULLES !)
- Attendre 5 minutes
- Préparer la librairie :

Réactifs	
Sequencing buffer (SQB)	37,5
Loading Beads (LB), mixed immediately before use	25,5
DNA Library (15ng)	12
Total	75

- Ouvrir le SpotON
- Charger 200μL de priming mix dans le priming port
- Mélanger la librairie pour resuspendre les billes
- Charger 75μL de librairie goutte à goutte sur le SpotON
- Refermer le SpotON puis le priming port
- Lancer le run

Auteurs : Prénom (minuscule) + NOM (MAJUSCULE) et /ou Nom du groupe de travail

Contacts : (facultatif) Prénom (minuscule) + NOM (MAJUSCULE) + Fonction

Date de 1^{ère} version :

Mots clés : (obligatoire pour la GED)