HCL HOSPICES CIVILS DELYON			
SECTOR .	Support d'Enregistrement	Version n° 1 du (10/06/2020)	Codification
Emetteur : ir	nstance, direction, groupe travail	Validation : direction, instance	
Destinataire	: unités, fonctions concernées		

Date :	Manipulateur :	
Date.	iviariipulateui .	

# 1 Echantillons et extraction Emag

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

### 2 RT

Réactifs	Χ 1 (μL)	Χ (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	Χ 1 (μL)	Χ (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

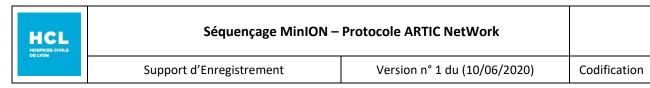
→ Programme ARTIC-RT-2

23°C – 10 minutes 55°C – 20 minutes 80°C – 10 minutes

4°C – Hold

# 3 PCR et clean-up

Réactifs	Χ 1 (μL)	Χ (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	-



#### → Programme ARTIC-PCR

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

- → 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	Χ 1 (μL)	Χ (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	Χ 1 (μL)	Χ (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	Χ 1 (μL)	Χ (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 1ère version :

Mots clés: (obligatoire pour la GED)