
	Préparation des librairies pour MiSeq et NextSeq		
	Mode Opérateur	Version n° 1 du 02/01/2020	Codification


Emetteur : instance, direction, groupe travail	Validation : direction, instance...
Destinataire : unités, fonctions concernées...	

Table des matières

1	Objet et champ d'application	3
2	Contenu du document	3
2.1	Matériel et réactifs.....	3
2.1.1	Kit Life Technologies : TURBO DNase (Ref : AM2239/AM2238).....	3
2.1.2	Kit NEB : NEBNext Ultra II RNA First Strand Synthesis Module (Ref : E7771S/L).....	3
2.1.3	Kit NEB : NEBNext Ultra II Non Directional RNA Second Strand Synthesis Module (Ref : E6111S/L) .	3
2.1.4	Kit Illumina : Nextera DNA Flex Pre-Enrichment Library Prep (Ref : 20025523/20025524).....	4
2.1.5	Kit Illumina : Nextera DNA Flex Enrichment Reagents (Ref : 20025523/20025524)	4
2.1.6	IDT for Illumina Nextera DNA UD Indexes (Ref : Set A 20027213 – Set B 20027214 – Set C 20027215 – Set D 20027216 – Set A,B,C,D 200272117)	4
2.2	Etape 1 : Extraction et traitement DNase.....	5
2.3	Etape 2 : Purification sur billes	5
2.4	Etape 3 : Premier brin d'ADNc.....	6
2.5	Etape 4 : Second Brin d'ADNc.....	7
2.6	Etape 4 : Purification sur billes et dosage Quant-It	7
2.7	Etape 6 : Tagmentation de l'ADNc et purification.....	8
2.8	Etape 7 : Amplification de l'ADN tagmenté	9
2.9	Etape 8 : Purification	9
2.10	Etape 9 : Pool des librairies.....	10
2.11	Etape 10 : Hybridation des sondes Capture	11
2.12	Etape 11 : Capture	11
2.13	Etape 12 : Amplification des librairies.....	12
2.14	Etape 13 : Purification	13
2.15	Etape 14 : Dosage Qubit / Bioanalyzer	14
2.15.1	Qubit dsDNA HS Assay	14
2.15.2	Bioanalyzer (facultatif).....	14
2.16	Etape 15 : Dilution des librairies	15

	Préparation des librairies pour MiSeq et NextSeq		
	Mode Opérateur	Version n° 1 du 02/01/2020	Codification

2.17	Etape 16 : Dénaturation et préparation de la librairie finale	15
3	Documents de références.....	16
4	Documents Associés.....	16

	Préparation des librairies pour MiSeq et NextSeq		
	Mode Opérateur	Version n° 1 du 02/01/2020	Codification

1 Objet et champ d'application

Ce MO décrit les différentes étapes du protocole de Capture pour le séquençage sur NextSeq500 Illumina. Il s'applique à l'ensemble du personnel susceptible de faire du séquençage Illumina.

2 Contenu du document

2.1 Matériel et réactifs

Ethanol absolu	Extracteur eMag + tubes de lyse
Eau RNase-free	Thermocycler
Billes Agencourt AMPure XP	Agitateur / vortex
Billes Macherey Nagel	Centrifugeuses tubes / plaques
NaOH 10N	Portoirs magnétiques tubes / plaques
Tris 1M	Incubateur de plaque
Plaques 96wp Midi + film	Séquenceur NextSeq500 Illumina
Barrettes + bouchons	Lecteur de plaque + kit Quant-it
Tubes 1,5mL LoBind	Qubit + dsDNA HS assay kit
Pipettes + cônes	

2.1.1 Kit Life Technologies : TURBO DNase (Réf. : AM2239/AM2238)


Nom du réactif	Température de stockage	Couleur
10X TURBO DNase Buffer	-20°C	Vert
TURBO DNase, 2U/μL	-20°C	Blanc

2.1.2 Kit NEB : NEBNext Ultra II RNA First Strand Synthesis Module (Réf. : E7771S/L)

Nom du réactif	Température de stockage	Couleur
NEBNext First Strand Synthesis Reaction Buffer	-20°C	Violet
NEBNext First Strand Synthesis Enzyme mix	-20°C	Violet
Random Primer	-20°C	Violet

2.1.3 Kit NEB : NEBNext Ultra II Non Directional RNA Second Strand Synthesis Module (Réf. : E6111S/L)

Nom du réactif	Température de stockage	Couleur
NEBNext Second Strand Synthesis Reaction Buffer	-20°C	Orange
NEBNext Second Strand Synthesis Enzyme Mix	-20°C	Orange

	Préparation des librairies pour MiSeq et NextSeq		
	Mode Opérateur	Version n° 1 du 02/01/2020	Codification

2.1.4 Kit Illumina : Nextera DNA Flex Pre-Enrichment Library Prep (Réf. : 20025523/20025524)

Acronyme	Nom du réactif	Température de stockage	Couleur
ST2	Stop Tagment Buffer 2	+4°C	Rouge
TWB	Tagment Wash Buffer	+4°C	
eBLT	Enrichment BLT	+4°C	Jaune
RSB	Resuspension buffer	+4°C	
TB1	Tagmentation Buffer 1	-20°C	
EPM	Enhanced PCR Mix	-20°C	

2.1.5 Kit Illumina : Nextera DNA Flex Enrichment Reagents (Réf. : 20025523/20025524)

Acronyme	Nom du réactif	Température de stockage	Couleur
SMB	Streptavidin Magnetic Beads	+4°C	Rouge
RSB	Resuspension Buffer	+4°C	
EHB2	Enrich Hyb Buffer 2	+4°C	Jaune
ET2	Elute Target Buffer 2	+4°C	
EE1	Enrichment Elution Buffer 1	-20°C	
EEW	Enhanced Enrichment Wash	-20°C	Ambre
PPC	PCR Primer Cocktail	-20°C	
HP3	2N NaOH	-20°C	
NHB2	Hyb Buffer 2 + IDT NXT Blockers	-20°C	Bleu
EPM	Enhanced PCR Mix	-20°C	


2.1.6 IDT for Illumina Nextera DNA UD Indexes (Réf. : Set A 20027213 – Set B 20027214 – Set C 20027215 – Set D 20027216 – Set A,B,C,D 200272117)

Température de stockage : -20°C

Plaques d'index prêtes à l'emploi

2.1.7 Illumina Respiratory virus Oligos Panel (Réf. : 20042472)

Température de stockage : -20°C

	Préparation des librairies pour MiSeq et NextSeq		
	Mode Opérateur	Version n° 1 du 02/01/2020	Codification

2.2 Etape 1 : Extraction et traitement DNase

- 1 Décongeler les échantillons primaires
- 2 Transférer **200µL** d'échantillons dans un tube de lyse eMag contenant 2mL de tampon de lyse
- 3 Procéder à l'extraction sur l'automate
- 4 Elution dans 50µL
- 5 Préparer le mix de DNase :

	Réactifs	Volume (µL)
	10X TURBO DNase Buffer	2
	TURBO DNase 2U/µL	1
	RNasine	0,2
	Total	3,2


- 6 Répartir le mix dans des barrettes 0,2µL
- 7 Transférer **15µL** d'extrait d'ARN
- 8 Mélanger par aspiration refoulement
- 9 Centrifuger
- 10 Incuber 1h30 à 37°C

2.3 Etape 2 : Purification sur billes

Préparer de l'éthanol à 70% extemporanément et le conserver à -20°C

Remettre les billes magnétiques Macherey Nagel en suspension

- 1 Ajouter **10µL** de billes (0,5X), mélanger par aspiration refoulement
- 2 Incuber 5 minutes à température ambiante
- 3 Placer le tube sur un portoir magnétique
- 4 Éliminer le surnageant une fois que celui-ci est clair
- 5 Ajouter **200µL** d'éthanol à 70%
- 6 Incuber 30 secondes puis retirer l'éthanol
- 7 Ajouter **200µL** d'éthanol à 70%
- 8 Incuber 30 secondes
- 9 Eliminer le maximum d'éthanol
- 10 Laisser sécher les billes jusqu'à ce que la surface soit mate (ne pas attendre le craquèlement)
- 11 Retirer les tubes du portoir magnétique et reprendre le culot de billes avec **17µL** d'eau nuclease-free
- 12 Incuber 2 minutes à température ambiante
- 13 Placer les tubes sur le portoir magnétique
- 14 Transférer **15µL** de surnageant dans une nouvelle plaque

	Préparation des librairies pour MiSeq et NextSeq		
	Mode Opérateur	Version n° 1 du 02/01/2020	Codification

2.4 Etape 3 : Premier brin d'ADNc

Kit : NEBNext Ultra II RNA First Strand Synthesis Module

Input : 1 – 100ng total d'ARN purifié

- 1 Sur glace, mélanger dans une plaque :

Réactifs	Volume (µL)
Purified RNA	5
NEBNext First Strand Synthesis Reaction Buffer	4
Random Primer	1
Total	10

- 2 Mélanger par aspiration refoulement
- 3 Incuber 5 minutes à 65°C
- 4 Transférer immédiatement sur glace
- 5 Ajouter les réactifs suivants :


Réactifs	Volume (µL)
Nuclease free water	8
NEBNext First Strand Synthesis Enzyme mix	2
Primed RNA	10
Total	20

- 6 Mélanger par aspiration refoulement
- 7 Incuber sur thermocycler (programme ...) – couvercle chauffé au minimum à 80°C

Temps	Température
10 minutes	25°C
50 minutes	42°C
15 minutes	70°C
∞	4°C

Note : Ce programme a été créé avec des pauses pour chaque étape où des ajouts de réactifs sont nécessaires, jusqu'à la fabrication du second brin. Cliquer sur « continuer » pour passer à l'étape suivante.

- 8 Centrifuger puis passer à l'étape suivante

	Préparation des librairies pour MiSeq et NextSeq		
	Mode Opérateur	Version n° 1 du 02/01/2020	Codification

2.5 Etape 4 : Second Brin d'ADNc

Kit : *NEBNext Ultra II Non Directional RNA Second Strand Synthesis Module*

- 1 Sur glace, préparer le mix suivant :

	Réactifs	Volume (µL)
First-strand synthesis product		20
NEBNext Second Strand Synthesis Reaction Buffer		8
NEBNext Second Strand Synthesis Enzyme Mix		4
Nuclease free water		48
Total		80

- 2 Mélanger par aspiration refoulement
- 3 Incuber sur thermocycler 1 heure à 16°C (suite du programme précédent)

2.6 Etape 5 : Purification sur billes et dosage Quant-It


Préparer de l'éthanol à 70% extemporanément et le conserver à -20°C

Remettre les billes magnétiques Macherey Nagel en suspension

- 1 Ajouter **144µL** de billes (1,8X), mélanger par aspiration refoulement
- 2 Incuber 5 minutes à température ambiante
- 3 Placer le tube sur un portoir magnétique
- 4 Éliminer le surnageant une fois que celui-ci est clair
- 5 Ajouter **200µL** d'éthanol à 70%
- 6 Incuber 30 secondes puis retirer l'éthanol
- 7 Ajouter **200µL** d'éthanol à 70%
- 8 Incuber 30 secondes
- 9 Éliminer le maximum d'éthanol
- 10 Laisser sécher les billes jusqu'à ce que la surface soit mate (ne pas attendre le craquèlement)
- 11 Retirer les tubes du portoir magnétique et reprendre le culot de billes avec **53µL** d'eau nuclease free
- 12 Incuber 2 minutes à température ambiante
- 13 Placer les tubes sur le portoir magnétique
- 14 Transférer **50µL** de surnageant dans une nouvelle plaque

Mettre le kit Quant-It 30 minutes à température ambiante avant utilisation

- 15 Dans une plaque noire :
 - Colonnes 1 à 3, déposer 190µL de réactif + 10µL de standard (dépôt en triplicat – 8 standards)
 - Autres colonnes, déposer 198µL de réactif + 2 µL d'ADNc à doser

	Préparation des librairies pour MiSeq et NextSeq		
	Mode Opérateur	Version n° 1 du 02/01/2020	Codification

Note : Bien respecter le plan de plaque initial avec les standards dans les 3 premières colonnes car il n'est pas possible de changer ce plan sur le logiciel sans éditer un nouveau programme

- 16 Attendre 2 minutes minimum avant lecture
- 17 Le résultat de dosage est donné en ng/μL et tient compte du facteur de dilution

2.7 Etape 6 : Tagmentation de l'ADNc et purification

Kit : Nextera DNA Flex Pre-Enrichment Library Prep

- 1 Transférer **30μL** ADNc dans une plaque 96wp
- 2 Préparer le mix suivant :

Tagmentation Master mix	Volume (μL)
eBLT (Enrichment Bead-Linked Transposomes)	11,5
TB1 (Tagmentation Buffer 1)	11,5
Total	23


- 3 Vortexer puis transférer **20μL** de Tagmentation Master Mix sur chaque ADNc (possibilité de répartir le mix en barrettes puis de distribuer avec une pipette multicanaux)
- 4 Mélanger par aspiration refoulement / vortex 1 minutes à 1600rpm
- 5 Incuber 5 minutes à 55°C sur un thermocycler avec le programme « TAG program »

Note : Attendre que la température descende à 10°C pour continuer

- 6 Laisser la plaque 2 minutes à température ambiante
- 7 Ajouter **10μL** ST2
- 8 Mélanger et resuspendre les billes délicatement par aspiration refoulement
- 9 Incuber 5 minutes à température ambiante
- 10 Placer la plaque sur un portoir magnétique (environ 3 minutes)
- 11 Retirer le surnageant
- 12 Lavage à répéter 2 fois :
 - Enlever la plaque du support magnétique puis ajouter **100μL** de TWB

Note : le TWB mousse beaucoup, éviter les bulles lors des pipetages

 - Mélanger délicatement par aspiration refoulement / vortex 1 minutes 1600rpm
 - Placer sur le portoir magnétique
 - Retirer le surnageant lorsqu'il est clair
- 13 Enlever la plaque du support magnétique puis ajouter **100μL** de TWB
- 14 Mélanger délicatement par aspiration refoulement / vortex 1 minutes 1600rpm
- 15 Placer sur le portoir magnétique sans retirer le surnageant

	Préparation des librairies pour MiSeq et NextSeq		
	Mode Opérateur	Version n° 1 du 02/01/2020	Codification

2.8 Etape 7 : Amplification de l'ADN tagmenté

Kit : Nextera DNA Flex Pre-Enrichment Library Prep

- 1 Préparer le mix suivant :

	PCR Master Mix	Volume (µL)
	EPM (Enhanced PCR Mix)	23
	Nuclease free water	23
	Total	46

- 2 Retirer le surnageant TWB de la plaque contenant les ADN tagmenté
- 3 Retirer la plaque du support magnétique
- 4 Ajouter immédiatement **40µL** de PCR Master Mix
- 5 Mélanger par aspiration refoulement / vortexer 1 minute 1600rpm
- 6 Centrifuger la plaque 30 secondes à 280g
- 7 Centrifuger la plaque Index Adapter (Index 1 i7 et Index 2 i5) 1 minute à 1000g
- 8 Percer les puits contenant les index sélectionnés à l'aide d'un cône en changeant de cône à chaque puits
- 9 Prélever **10µL** d'index et transférer dans la plaque contenant les ADN fragmenté et le PCR Master Mix
- 10 Mélanger par aspiration refoulement / vortexer 1 minute 1600rpm
- 11 Centrifuger la plaque 30 secondes à 280g
- 12 Placer sur un thermocycler et lancer le programme « eBLT PCR » (lid : 100°C)

Temps	Température	Cycles
3 minutes	72°C	
3 minutes	98°C	
20 secondes	98°C	X 12
30 secondes	60°C	
1 minute	72°C	
3 minutes	72°C	
Hold	4°C	

STOPPING POINT

Conservation à -20°C pendant 30 jours


2.9 Etape 8 : Purification

Préparer de l'éthanol 80%

Billes Agencourt AMPure XP

Plaque Midi

Kit : Nextera DNA Flex Pre-Enrichment Library Prep

	Préparation des librairies pour MiSeq et NextSeq		
	Mode Opérateur	Version n° 1 du 02/01/2020	Codification

- 1 Vortexer la plaque 1 minute à 1800 rpm puis la placer sur un support magnétique.
- 2 Transférer **45µL** de surnageant dans une nouvelle plaque
- 3 Ajouter **77µL** d'eau nuclease-free
- 4 Ajouter **88µL** de billes AMPure XP
- 5 Mélanger par aspiration refoulement / vortex 1 minute à 1800rpm
- 6 Incuber 5 minutes à température ambiante
- 7 Placer sur un portoir magnétique
- 8 Pendant l'incubation, ajouter **20µL** de billes AMPure XP dans de nouveaux puits
- 9 Transférer **200µL** de surnageant sur les 20µL de billes, mélanger par aspiration refoulement / vortex 1 minute à 1800rpm
- 10 Incuber 5 minutes à température ambiante
- 11 Placer la plaque sur un portoir magnétique
- 12 Retirer le surnageant délicatement
- 13 Laisser la plaque sur le support magnétique pour les lavages
- 14 Répéter 2 fois le lavage :
 - Ajouter **200µL** d'éthanol 80% sans mélanger
 - Incuber 30 secondes
 - Retirer l'éthanol délicatement
- 15 Éliminer l'intégralité de l'éthanol délicatement
- 16 Laisser sécher les billes sur le portoir magnétique pendant 5 minutes
- 17 Retirer du support magnétique
- 18 Ajouter **17µL** RSB sur les billes
- 19 Vortexer 2 minutes à 1800rpm
- 20 Incuber 2 minutes à température ambiante
- 21 Placer la plaque sur un portoir magnétique
- 22 Transférer **15µL** de surnageant dans une nouvelle plaque
- 23 Réaliser un dosage Quant-It comme à l'**Etape 4** en respectant le plan de plaque


STOPPING POINT

Conservation à -20°C pendant 30 jours

2.10 Etape 9 : Pool des librairies

Chaque échantillon est classé selon 2 critères :

- Le Ct :
 - Ct < 25
 - Ct [25 ; 35]
 - Ct > 35
- Un seuil, déterminé en fonction de la valeur de l'ensemble des dosages des échantillons (variable : 500ng, 200ng, 150ng, etc...)

	Préparation des librairies pour MiSeq et NextSeq		
	Mode Opérateur	Version n° 1 du 02/01/2020	Codification

Au total ce sont donc 6 pools à constituer avec un volume final minimum de 30µL et un volume maximum de 13µL par échantillon. Effectuer le calcul suivant pour déterminer le volume d'échantillon à mettre dans chaque pool :

$$\text{Volume librairie (}\mu\text{L)} = \frac{\text{seuil déterminé (ng)}}{\text{dosage (ng}/\mu\text{L)}}$$

Compléter avec du RSB si le volume du pool est inférieur à 30µL.

2.11 Etape 10 : Hybridation des sondes Capture

Kit : Nextera DNA Flex Enrichment Reagents

Kit : Respiratory virus Oligos panel

- 1 Dans une barrette ajouter **dans l'ordre** (ne pas faire de pré-mix):
 - 30µL de pool préparé précédemment
 - 50µL NHB2
 - 10µL Enrichment Probe Panel
 - 10µL EHB2
- 2 Mélanger par aspiration refoulement
- 3 Centrifuger
- 4 Lancer le programme « NF-HYB program »

Temps	Température	
5 minutes	95°C	
1 minute	94-58°C	2°C par minutes
Hold	58°C	Minimum 90 minutes – idéal une nuit


2.12 Etape 11 : Capture

Kit : Nextera DNA Flex Enrichment Reagents

- 1 Allumer l'incubateur de plaque et le programmer à 58°C (attention il met du temps à se stabiliser)
- 2 Centrifuger la barrette
- 3 Transférer l'intégralité du volume dans une plaque Midi
- 4 Ajouter 250µL SMB dans chaque puits
- 5 Vortexer 4 minutes à 1200rpm
- 6 Incuber 15 minutes à 58°C dans l'incubateur
- 7 Préchauffer EEW à 58°C

Note : Possibilité d'aliqoter EEW directement dans la plaque pour des transferts simplifiés avec une pipette multicanale

- 8 Placer la plaque sur un support magnétique


	Préparation des librairies pour MiSeq et NextSeq		
	Mode Opérateur	Version n° 1 du 02/01/2020	Codification

- 9 Éliminer délicatement le surnageant
- 10 Lavage à répéter 3 fois :
 - Ajouter **200µL** EEW préchauffé dans chaque puits
 - Vortexer la plaque 4 minutes à 1600rpm
 - Incuber 5 minutes dans l'incubateur à 58°C
 - Placer sur un support magnétique
 - Retirer le surnageant
- 11 Retirer du support magnétique, ajouter **200µL** EEW
- 12 Vortexer 4 minutes à 1600rpm
- 13 Transférer **200µL** dans un nouveau puits
- 14 Incuber 5 minutes dans l'incubateur à 58°C
- 15 Préparer le mix d'élution (volume mort déjà inclut) :
 - **28,5µL** EE1
 - **1,5µL** HP3
- 16 Centrifuger brièvement la plaque
- 17 Placer sur un support magnétique
- 18 Retirer le surnageant puis centrifuger
- 19 Placer sur un support magnétique
- 20 Éliminer toute trace de surnageant
- 21 Vortexer et centrifuger le mix d'élution
- 22 Retirer la plaque du support magnétique et ajouter **23µL** de mix d'élution
- 23 Vortexer 2 minutes à 1800rpm
- 24 Incuber 2 minutes à température ambiante
- 25 Centrifuger la plaque
- 26 Placer sur un support magnétique
- 27 Transférer **21µL** de surnageant dans une nouvelle barrette
- 28 Ajouter **4 µL** ET2
- 29 Mélanger par aspiration refoulement
- 30 Centrifuger brièvement

2.13 Etape 12 : Amplification des librairies

Kit : Nextera DNA Flex Enrichment Reagents

- 1 Ajouter **5µL** PPC dans chaque puits
- 2 Ajouter **20µL** EPM dans chaque puits
- 3 Mélanger par aspiration refoulement
- 4 Centrifuger brièvement
- 5 Lancer le programme « AMP Program »

	Préparation des librairies pour MiSeq et NextSeq		
	Mode Opérateur	Version n° 1 du 02/01/2020	Codification

Temps	Température	Cycles
30 secondes	98°C	X 12
10 secondes	98°C	
30 secondes	58°C	
30 secondes	72°C	
5 minutes	72°C	
Hold	10°C	

STOPPING POINT

Stockage +4°C pour 2 jours


2.14 Etape 13 : Purification

Préparer de l'éthanol à 70%

Billes Macherey Nagel

Tubes 1,5mL LoBind

- 1 Centrifuger brièvement la barrette
- 2 Transférer le surnageant dans des tubes de 1,5mL
- 3 Ajouter **45µL** de billes
- 4 Mélanger par aspiration refoulement
- 5 Incuber 5 minutes à température ambiante
- 6 Placer sur un support magnétique
- 7 Éliminer délicatement le surnageant
- 8 Répéter 2 fois le lavage :
 - o Ajouter **200µL** d'éthanol 70%
 - o Incuber 30 secondes
 - o Éliminer l'éthanol
- 9 Éliminer l'intégralité de l'éthanol
- 10 Laisser sécher les billes 5 minutes
- 11 Retirer les tubes du support magnétique et ajouter **32µL** RSB
- 12 Mélanger par aspiration refoulement
- 13 Incuber 5 minutes à température ambiante
- 14 Centrifuger brièvement
- 15 Placer les tubes sur un support magnétique
- 16 Transférer **30µL** de surnageant dans un nouveau tube de 1,5mL annoter avec le numéro du pool et la date de fabrication

	Préparation des librairies pour MiSeq et NextSeq		
	Mode Opérateur	Version n° 1 du 02/01/2020	Codification

2.15 Etape 14 : Dosage Qubit / Bioanalyzer

2.15.1 Qubit dsDNA HS Assay

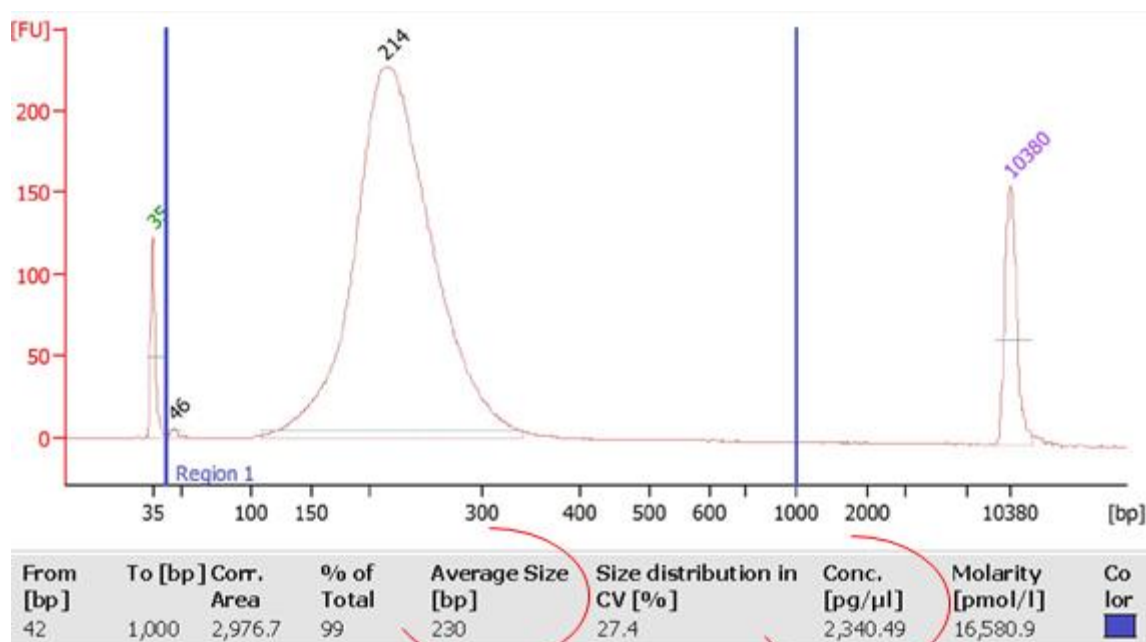
Sortir le kit au moins 30 minutes avant le dosage

- 1 Préparer la solution de travail :
 - 199µL de Buffer
 - 1µL de Reagent
- 2 Pour les standards :
 - 190µL de solution de travail
 - 10µL de standard
- 3 Pour les librairies :
 - 198µL de solution de travail
 - 2µL de librairie
- 4 Incuber 2 minutes minimum
- 5 Vortexer puis doser
- 6 Compléter le tableau Excel pour déterminer la dilution à effectuer pour obtenir une librairie à 2ng/µL

2.15.2 Bioanalyzer (facultatif)


Suivre le mode d'emploi « Agilent DNA 1000 kit Quick Start Guide » disponible à proximité du Bioanalyzer.

Cette analyse permet de visualiser le profil de la librairie. Le profil idéal se présente comme l'exemple ci-dessous. On retrouve la taille moyenne des fragments obtenus et la concentration de la librairie (possibilité de vérifier la concordance avec le dosage Qubit).



STOPPING POINT

Stockage -20°C pour 7 jours

	Préparation des librairies pour MiSeq et NextSeq		
	Mode Opérateur	Version n° 1 du 02/01/2020	Codification

2.16 Etape 15 : Dilution des librairies

Calculer la quantité de matière de la librairie avec la formule suivante :

$$Concentration (nM) = \frac{(... \text{ ng}/\mu\text{L} \times 10^6)}{660 \text{ g/mol} \times \text{taille moyenne de la librairie}}$$

Calculer les volumes de RSB et de librairie pour obtenir une librairie finale à 2nM

Pooler l'ensemble des librairies en fonction du nombre d'échantillons :

Ex : Pool 1 (12 échantillons) et pool 2 (6 échantillons) → 12μL de pool 1 + 6μL de pool 2

2.17 Etape 16 : Dénaturation et préparation de la librairie finale


Préparer 50μL d'une solution de NaOH à 0,2N à partir d'une solution à 10N (1μL NaOH + 49μL eau nuclease-free)

Préparer 50μL d'une solution de Tris à 200mM à partir d'une solution à 1M (10μL Tris + 40μL eau nuclease-free)

- 1 Déposer **10μL** de pool final à 2nM dans un tube de 1,5mL
- 2 Ajouter **10μL** NaOH 0,2N
- 3 Vortexer et centrifuger
- 4 Incuber 5 minutes à température ambiante
- 5 Ajouter immédiatement **10μL** Tris 200mM
- 6 Vortexer et centrifuger
- 7 Ajouter **970μL** HT1 (librairie à 20pM)

Selon les recommandations Illumina, la concentration finale de la librairie doit être de 1,5pM

- 1 Ajouter **1201,7μL** HT1 dans un tube de 1,5mL
- 2 Ajouter **1,3μL** PhiX
- 3 Ajouter **97μL** de librairie finale à 20pM (concentration finale 1,5pM)
- 4 Charger la cassette de séquençage
- 5 Démarrer le séquençage

	Préparation des librairies pour MiSeq et NextSeq		
	Mode Opérateur	Version n° 1 du 02/01/2020	Codification

3 Documents de références

NEB : Instruction Manual NEBNext Ultra II RNA First Strand Synthesis Module – Version 3.0_4/20

NEB : Instruction Manual NEBNext Ultra II Non-directional RNA Second Strand Synthesis Module – Version 5.0_4/20

Illumina : Reference Guide Nextera Flex for Enrichment – Version Novembre 2019

Illumina : Denature and Dilute Libraries Guide NextSeq System – Version Décembre 2018

4 Documents Associés

Tableau Excel « Données Run Capture Illumina »

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)