



| | | | |
|--|--|----------------------------|--------------|
|  | Séquençage MinION – Protocole ARTIC NetWork | | |
| | 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 | 2 |
| 2 | Contenu du document | 2 |
| 2.1 | Matériel et réactifs..... | 2 |
| 2.1.1 | Reverse Transcription..... | 2 |
| 2.1.2 | PCR..... | 2 |
| 2.1.3 | End-prep..... | 2 |
| 2.1.4 | Ligation des barcodes..... | 3 |
| 2.1.5 | Librairies..... | 3 |
| 2.2 | Etape 1 : Extraction ARN | 3 |
| 2.3 | Etape 2 : Reverse transcription..... | 3 |
| 2.4 | Etape 3 : PCR, purification sur billes et dosage..... | 4 |
| 2.5 | Etape 4 : End prep..... | 5 |
| 2.6 | Etape 5 : Ligation des barecodes, purification et dosage | 5 |
| 2.7 | Etape 6 : Ligation des adaptateurs purification et dosage | 6 |
| 2.8 | Etape 7 : Connexion du MinIT, et chargement de la FlowCell | 7 |

| | | | |
|--|--|----------------------------|--------------|
|  | Séquençage MinION – Protocole ARTIC NetWork | | |
| | Mode Opérateur | Version n° 1 du 02/01/2020 | Codification |

1 Objet et champ d'application

Ce MO décrit les différentes étapes du protocole ARTIC pour le séquençage du SARS-CoV 2 sur MinION de Nanopore.

Il s'applique à l'ensemble du personnel susceptible de faire du séquençage Nanopore.

2 Contenu du document

2.1 Matériel et réactifs

| | |
|---------------------------------|------------------------------------|
| Ethanol absolu | Thermocycler |
| Eau nuclease-free | Agitateur / vortex |
| Billes Agencourt AMPure XP | Centrifugeuses tubes/barrettes |
| Barrettes + bouchons | Portoirs magnétiques tubes |
| Tubes 1,5mL LoBind | Séquenceur MinION Nanopore + MinIT |
| Pipettes + cônes | Kit Qubit dsDNA HS assay kit |
| Extracteur eMag + tubes de lyse | Kit Qubit dsDNA BR assay kit |

2.1.1 Reverse Transcription


| Nom du réactif | Fournisseur | Référence | T°C de stockage |
|--|-------------------------|-----------|-----------------|
| Random primer mix (60µM) | NEB | S1330 | -20°C |
| dNTP solution (10mM) | NEB | N0447 | -20°C |
| Kit SuperScript IV reverse transcriptase | ThermoFisher Scientific | 18090010 | -20°C |
| RNaseOUT (40U/µL) | Life technologies | 10777019 | -20°C |

2.1.2 PCR

| Nom du réactif | Fournisseur | Référence | T°C de stockage |
|--------------------------------|-------------|-----------|-----------------|
| Covid-19 primers (100µM) | - | - | -20°C |
| Kit Q5 Hot Start High Fidelity | NEB | M0493 | -20°C |

2.1.3 End-prep

| Nom du réactif | Fournisseur | Référence | T°C de stockage |
|---|-------------|-----------|-----------------|
| Kit NEBNext Ultra II End repair/dA-tailing Module | NEB | E7546 | -20°C |

| | | | |
|--|---|----------------------------|--------------|
|  | Séquençage MinION – Protocole ARTIC NetWork | | |
| | Mode Opérateur | Version n° 1 du 02/01/2020 | Codification |

2.1.4 Ligation des barcodes

| Nom du réactif | Fournisseur | Référence | T°C de stockage |
|--|-------------|------------|-----------------|
| Kit NEBNext Ultra II Ligation Module | NEB | E7595 | -20°C |
| Native Barcoding Expansion 1 – 12 (+AMII) | Nanopore | EXP-NBD104 | -20°C |
| Native Barcoding Expansion 13 – 24 (+AMII) | Nanopore | EXP-NBD114 | -20°C |
| Short Fragment Buffer (SFB) | Nanopore | EXP-SFB001 | -20°C |

2.1.5 Bibliothèques

| Nom du réactif | Fournisseur | Référence | T°C de stockage |
|-----------------------------------|-------------|-------------|-----------------|
| Kit NEBNext Quick Ligation Module | NEB | E6056 | -20°C |
| Ligation Sequencing Kit contents | Nanopore | SQK-LSK109 | -20°C |
| FlowCell Priming Kit contents | Nanopore | EXP-FLP002 | -20°C |
| FlowCell | Nanopore | FLO-MIN106D | +4°C |

2.2 Etape 1 : Extraction ARN

- 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

2.3 Etape 2 : Reverse transcription

Kit : *SuperScript IV reverse transcriptase*


Input :

| Ct (RT-qPCR) | Dilution |
|--------------|----------|
| 18-35 | - |
| 15-18 | 1/10 |
| 12-15 | 1/100 |

- 1 Sur glace, mélanger dans des tubes de 0,2mL (ou barrettes) :

| Réactifs | Volume (µL) |
|--------------------------|-------------|
| ARN | 11 |
| Random primer mix (60µM) | 1 |
| dNTPs (10mM) | 1 |
| Total | 13 |

- 2 Incuber 5 minutes à 65°C (programme ARTIC-RT-1)
- 3 Placer immédiatement dans la glace et laisser minimum 1 minute

| | | | |
|--|--|----------------------------|--------------|
|  | Séquençage MinION – Protocole ARTIC NetWork | | |
| | Mode Opérateur | Version n° 1 du 02/01/2020 | Codification |

- 4 Préparer le mix suivant :

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

- 5 Ajouter 7µL de mix dans chaque tube
 6 Incuber sur thermocycler (programme ARTIC-RT-2)

| Temps | Température |
|------------|-------------|
| 10 minutes | 23°C |
| 20 minutes | 55°C |
| 15 minutes | 80°C |
| ∞ | 4°C |

2.4 Etape 3 : PCR, purification sur billes et dosage

Kit : Q5 Hot Start High Fidelity - NEB


- 1 Diluer à 10µM les pools de primer à 100µM
 2 Préparer le mix suivant :

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

- 3 Mélanger par aspiration refoulement
 4 Placer dans un thermocycler et lancer le programme ARTIC-PCR :

| Temps | Température | Cycles |
|-------------|-------------|--------|
| 30 secondes | 98°C | X 35 |
| 15 secondes | 98°C | |
| 5 minutes | 65°C | |
| Hold | 4°C | |

- 5 Pooler les produits de PCR pool A et pool B dans un nouveau tubes 1,5mL.
 6 Sortir les billes 30 minutes avant utilisation
 7 Resuspendre les billes AMPure XP

| | | | |
|--|--|----------------------------|--------------|
|  | Séquençage MinION – Protocole ARTIC NetWork | | |
| | Mode Opérateur | Version n° 1 du 02/01/2020 | Codification |

- 8 Ajouter 50µL (0.5X) de billes au produit de PCR
- 9 Incuber 10 minutes à température ambiante et sous agitation
- 10 Centrifuger brièvement puis mettre sur un portoir magnétique pendant 5 minutes jusqu'à ce que le surnageant soit clair
- 11 Retirer le surnageant délicatement
- 12 Laver les billes avec 200µL d'éthanol 80%, tourner le tube de 180° pour déplacer les billes
- 13 Retirer l'éthanol délicatement
- 14 Répéter le lavage
- 15 Centrifuger et retirer l'intégralité de l'éthanol
- 16 Replacer sur le portoir magnétique et laisser sécher 30 secondes. Ne pas laisser craquer le culot
- 17 Resuspendre les billes dans 16µL d'eau nuclease free
- 18 Incuber 2 minutes à température ambiante
- 19 Placer sur le portoir magnétique
- 20 Transférer 15µL d'éluât dans un nouveau tube 1,5mL
- 21 Quantifier 1µL avec le kit Qubit BR

STOPPING POINT

Conservation à -20°C

2.5 Etape 4 : End prep

Kit : NEBNext Ultra II End Repair / dA-tailing Module

Input : 50ng d'ADNc / échantillon

- 1 Dilution des ADNc pour obtenir 50ng
- 2 Sur glace, préparer le mix suivant :


| | Réactifs | Volume (µL) |
|--|---|-------------|
| | cDNA | x |
| | Eau nuclease free | 12,5 - x |
| | NEBNext Ultra II End-prep reaction buffer | 1,75 |
| | NEBNext Ultra II End-prep enzyme Mix | 0,75 |
| | Total | 15 |

- 3 Mélanger par aspiration refoulement
- 4 Incuber 5 minutes à température ambiante (20°C) puis 5 minutes à 65°C (programme ARTIC End-prep)

2.6 Etape 5 : Ligation des barcodes, purification et dosage

Kit : NEBNext Ultra II Ligation Module

Kit : Native Barcoding expansion 1-12 et 13-24

| | | | |
|--|--|----------------------------|--------------|
|  | Séquençage MinION – Protocole ARTIC NetWork | | |
| | Mode Opérateur | Version n° 1 du 02/01/2020 | Codification |

Short Fragment Buffer (SFB)

Décongeler les barecodes et le SFB sur glace

- 1 Préparer le mix suivant

| | Réactifs | Volume (µL) |
|--|--------------------------------------|-------------|
| | Eau 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 |

- 2 Mélanger par aspiration refoulement
- 3 Incuber 20 minutes à température ambiante (20°C) puis 10 minutes à 65°C (programme ARTIC BarcodeLigation)
- 4 Pooler tous les ADN barcodés dans un nouveau tube 1,5mL
- 5 Ajouter 0.4X de billes AMPure XP
- 6 Incuber 10 minutes à température ambiante et sous agitation
- 7 Centrifuger brièvement et placer sur un portoir magnétique
- 8 Laver avec 700µL de SFB, resuspendre les billes délicatement par aspiration refoulement
- 9 Placer sur portoir magnétique puis retirer le surnageant lorsqu'il est clair
- 10 Répéter le lavage
- 11 Laver avec 100µL d'éthanol 80% sans resuspendre le culot
- 12 Retirer l'éthanol
- 13 Laisser sécher 30 secondes
- 14 Reprendre les billes avec 36µL d'eau nuclease free
- 15 Incuber 2 minutes à température ambiante
- 16 Transférer 35µL d'éluât dans un nouveau tube 1,5mL
- 17 Quantifier 1µL avec le kit Qubit HS

2.7 Etape 6 : Ligation des adaptateurs purification et dosage


Kit : NEBNext Quick ligation module

Adapter mix II (AMII)

Elution buffer (EB)

Short Fragment Buffer (SFB)

Input : 30-50ng d'ADN barcodés

| | | | |
|--|--|----------------------------|--------------|
|  | Séquençage MinION – Protocole ARTIC NetWork | | |
| | Mode Opérateur | Version n° 1 du 02/01/2020 | Codification |

- 1 Préparer le mix suivant :

| | Réactifs | Volume (µL) |
|--|---|-------------|
| | ADN barcodés | x (30-50ng) |
| | Eau nuclease free | 30 – x |
| | Adapter Mix II (AMII) | 5 |
| | NEBNext Quick Ligation Reaction Buffer (5X) | 10 |
| | Quick T4 DNA ligase | 5 |
| | Total | 50 |

- 2 Incuber 20 minutes à température ambiante (programme ARTIC AdapterLigation)
- 3 Ajouter 0.4X de billes AMPure XP (20µL)
- 4 Incuber 10 minutes à température ambiante et sous agitation
- 5 Centrifuger brièvement et placer sur un portoir magnétique
- 6 Laver avec 125µL de SFB, resuspendre les billes délicatement par aspiration refoulement
- 7 Placer sur portoir magnétique puis retirer le surnageant lorsqu'il est clair
- 8 Répéter le lavage
- 9 Centrifuger brièvement le tube puis retirer l'intégralité du SFB
- 10 Reprendre les billes avec 16µL EB
- 11 Replacer sur le portoir magnétique
- 12 Transférer 15µL d'éluât dans un nouveau tube 1,5mL
- 13 Quantifier 1µL avec le kit Qubit HS

STOPPING POINT

Conservation à 4°C jusqu'au séquençage

Conservation longue durée -80°C

2.8 Etape 7 : Connexion du MiniT et chargement de la FlowCell


Kit : FlowCell priming

Loading Beads (LB)

Sequencing Buffer (SQB)

Input : 15ng

- 1 Brancher le MiniT sur le secteur et l'allumer
- 2 Raccorder le MinION au MiniT
- 3 Sur l'ordinateur, se connecter en WiFi au MiniT
 - a. nom réseau : MT-111186
 - b. mot de passe : WarmButterflyWings98
- 4 Ouvrir le dossier [\\mt-111186](#)

| | | | |
|--|--|----------------------------|--------------|
|  | Séquençage MinION – Protocole ARTIC NetWork | | |
| | Mode Opérateur | Version n° 1 du 02/01/2020 | Codification |

- 5 Ouvrir MinKNOW

Attention : le lien ne fonctionne pas sous internet explorer – le copier puis l'ouvrir dans Chrome

- 6 Insérer la FlowCell dans le MinION
- 7 Lorsque la FlowCell apparaît à l'écran, cocher « Available » puis cliquer sur « Check FlowCells ». Le contrôle prend quelques minutes
- 8 Préparer le priming mix en ajoutant 30µL de FLT dans un tube neuf de FB
- 9 Une fois le contrôle de la FlowCell terminé, ouvrir le Priming Port en le pivotant (Figure 2)
- 10 Avec une P1000 réglée sur 200µL, insérer le cône dans le priming port puis faire tourner la molette jusqu'à 230µL, un liquide jaune doit remonter dans le cône, le jeter
- 11 Prélever 800µL de priming mix et l'insérer lentement et délicatement dans le priming port

Attention : ne pas insérer de bulles dans la FlowCell

- 12 Attendre 5 minutes
- 13 Préparer la librairie :


| | Réactifs | Volume (µL) |
|-------------------------|----------|-------------|
| Sequencing Buffer (SQB) | | 37,5 |
| Loading Beads (LB) | | 25,5 |
| DNA library (15ng) | | 12 |
| Total | | 75 |

Attention : bien resuspendre le LB, les billes sédimentent très rapidement

- 14 Ouvrir délicatement le SpotON (Figure 1)
- 15 Insérer 200µL de priming mix dans le priming port
- 16 Remettre en suspension les billes présentes dans la librairie puis ajouter goutte à goutte 75µL de librairie sur le SpotON

Il est possible de voir les billes se répartir sur la membrane

- 17 Refermer délicatement le SpotOn puis le priming port
- 18 Sur MinKNOW, cliquer sur « New Experiment »:
 - a. Sélectionner le kit SQK LSK109
 - b. BaseCalling ON
 - c. Sélectionner Fast BaseCalling
 - d. Barcoding OFF
 - e. La durée du séquençage peut être modifiée
- 19 Valider

| | | | |
|--|---|----------------------------|--------------|
|  | Séquençage MinION – Protocole ARTIC NetWork | | |
| | Mode Opérateur | Version n° 1 du 02/01/2020 | Codification |

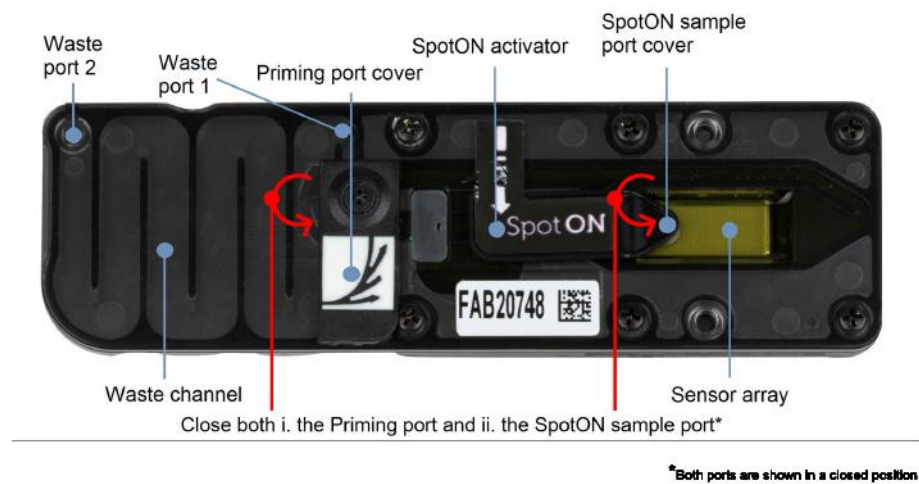


Figure 1 - Description de la FlowCell - Source : Nanopore

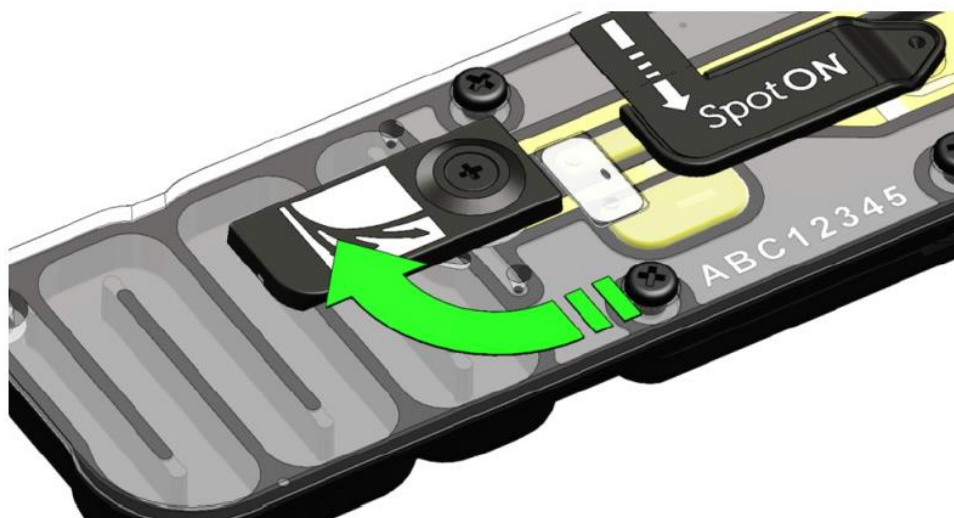


Figure 2 : Ouverture du priming port - Source : Nanopore

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)