|  |  |
| --- | --- |
| **Emetteur :** instance, direction, groupe travail | **Validation :** direction, instance… |
| **Destinataire :** unités, fonctions concernées… | |

Table des matières

[1 Objet et champ d'application 3](#_Toc40079996)

[2 Contenu du document 3](#_Toc40079997)

[2.1 Matériel et réactifs 3](#_Toc40079998)

[2.1.1 Kit Life Technologies : TURBO DNase (Ref : AM2239/AM2238) 3](#_Toc40079999)

[2.1.2 Kit NEB : NEBNext Ultra II RNA First Strand Synthesis Module (Ref : E7771S/L) 3](#_Toc40080000)

[2.1.3 Kit NEB : NEBNext Ultra II Non Directional RNA Second Strand Synthesis Module (Ref : E6111S/L) 3](#_Toc40080001)

[2.1.4 Kit Illumina : Nextera DNA Flex Pre-Enrichment Library Prep (Ref : 20025523/20025524) 4](#_Toc40080002)

[2.1.5 Kit Illumina : Nextera DNA Flex Enrichment Reagents (Ref : 20025523/20025524) 4](#_Toc40080003)

[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](#_Toc40080004)

[2.2 Etape 1 : Extraction et traitement DNase 5](#_Toc40080005)

[2.3 Etape 2 : Purification sur billes 5](#_Toc40080006)

[2.4 Etape 3 : Premier brin d’ADNc 6](#_Toc40080007)

[2.5 Etape 4 : Second Brin d’ADNc 7](#_Toc40080008)

[2.6 Etape 4 : Purification sur billes et dosage Quant-It 7](#_Toc40080009)

[2.7 Etape 6 : Tagmentation de l’ADNc et purification 8](#_Toc40080010)

[2.8 Etape 7 : Amplification de l’ADN tagmenté 9](#_Toc40080011)

[2.9 Etape 8 : Purification 9](#_Toc40080012)

[2.10 Etape 9 : Pool des librairies 10](#_Toc40080013)

[2.11 Etape 10 : Hybridation des sondes Capture 11](#_Toc40080014)

[2.12 Etape 11 : Capture 11](#_Toc40080015)

[2.13 Etape 12 : Amplification des librairies 12](#_Toc40080016)

[2.14 Etape 13 : Purification 13](#_Toc40080017)

[2.15 Etape 14 : Dosage Qubit / Bioanalyzer 14](#_Toc40080018)

[2.15.1 Qubit dsDNA HS Assay 14](#_Toc40080019)

[2.15.2 Bioanalyzer (facultatif) 14](#_Toc40080020)

[2.16 Etape 15 : Dilution des librairies 15](#_Toc40080021)

[2.17 Etape 16 : Dénaturation et préparation de la librairie finale 15](#_Toc40080022)

[3 Documents de références 16](#_Toc40080023)

[4 Documents Associés 16](#_Toc40080024)

# 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.

# Contenu du document

## Matériel et réactifs

Ethanol absolu

Eau RNase-free

Billes Agencourt AMPure XP

Billes Macherey Nagel

NaOH 10N

Tris 1M

Plaques 96wp Midi + film

Barrettes + bouchons

Tubes 1,5mL LoBind

Pipettes + cônes

Extracteur eMag + tubes de lyse

Thermocycler

Agitateur / vortex

Centrifugeuses tubes / plaques

Portoirs magnétiques tubes / plaques

Incubateur de plaque

Séquenceur NextSeq500 Illumina

Lecteur de plaque + kit Quant-it

Qubit + dsDNA HS assay kit

### 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 |

### 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 |

### 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 |

### 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 |  |

### 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 |  |

### 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

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

Température de stockage : -20°C

## 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** |

1. Répartir le mix dans des barrettes 0,2µL
2. Transférer **15µL** d’extrait d’ARN
3. Mélanger par aspiration refoulement
4. Centrifuger
5. Incuber 1h30 à 37°C

## 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

## 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** |

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

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

1. Mélanger par aspiration refoulement
2. 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.*

1. Centrifuger puis passer à l’étape suivante

## 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 |

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

## 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. 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 **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

1. 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

*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*

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

## 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 |

1. 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)
2. Mélanger par aspiration refoulement / vortex 1 minutes à 1600rpm
3. 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*

1. Laisser la plaque 2 minutes à température ambiante
2. Ajouter **10µL** ST2
3. Mélanger et resuspendre les billes délicatement par aspiration refoulement
4. Incuber 5 minutes à température ambiante
5. Placer la plaque sur un portoir magnétique (environ 3 minutes)
6. Retirer le surnageant
7. 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

1. Enlever la plaque du support magnétique puis ajouter **100µL** de TWB
2. Mélanger délicatement par aspiration refoulement / vortex 1 minutes 1600rpm
3. Placer sur le portoir magnétique sans retirer le surnageant

## 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 |

1. Retirer le surnageant TWB de la plaque contenant les ADN tagmenté
2. Retirer la plaque du support magnétique
3. Ajouter immédiatement **40µL** de PCR Master Mix
4. Mélanger par aspiration refoulement / vortexer 1 minute 1600rpm
5. Centrifuger la plaque 30 secondes à 280g
6. Centrifuger la plaque Index Adapter (Index 1 i7 et Index 2 i5) 1 minute à 1000g
7. Percer les puits contenant les indexs sélectionnés à l’aide d’un cône en changeant de cône à chaque puits
8. Prélever **10µL** d’index et transférer dans la plaque contenant les ADN fragmenté et le PCR Master Mix
9. Mélanger par aspiration refoulement / vortexer 1 minute 1600rpm
10. Centrifuger la plaque 30 secondes à 280g
11. 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*

## Etape 8 : Purification

Préparer de l’éthanol 80%

Billes Agencourt AMPure XP

Plaque Midi

*Kit : Nextera DNA Flex Pre-Enrichment Library Prep*

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*

## 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…)

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 :

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

## 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 |

## 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’aliquoter EEW directement dans la plaque pour des transferts simplifiés avec une pipette multicanale*

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

## 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 »

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

***STOPPING POINT***

*Stockage +4°C pour 2 jours*

## 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 :
   * Ajouter **200µL** d’éthanol 70%
   * Incuber 30 secondes
   * 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

## Etape 14 : Dosage Qubit / Bioanalyzer

### Qubit dsDNA HS Assay

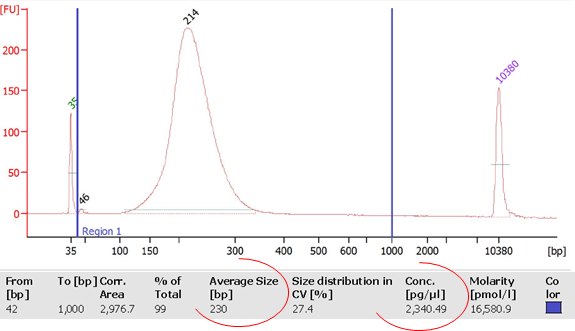
Sortir le kit au moins 30 minutes avant le dosage

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

### 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*

## Etape 15 : Dilution des librairies

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

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*

## 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

# 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

# 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 1ère version :

Mots clés : (obligatoire pour la GED)