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

Date : Manipulateur :

# Echantillons et extraction Emag

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |

* **200µL d’échantillon dans un tube de lyse contenant 2mL de tampon de lyse**

# 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

# 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** | - |

* **Programme ARTIC-PCR**

98°C – 30 secondes

98°C – 15 secondes

x 35

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**

# 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

# 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)

# 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

# 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)