



🛡️ Surveillance Génomique du Paludisme par la méthode Nanopore : Protocole Rapide NOMADS-MVP



Forked from [NOMADS-MVP: Rapid Genomic Surveillance of Malaria with Nanopore](#)

Karolina Mosler¹, Mulenga Mwenda², Daniel J Bridges, Jason Alexander Hendry¹

¹Max Planck Institute for Infection Biology; ²PATH Zambia



Arsene Zongo

Robert Koch Institut



Protocol Info: Karolina Mosler, Mulenga Mwenda, Daniel J Bridges, Jason Alexander Hendry . Surveillance Génomique du Paludisme par la méthode Nanopore : Protocole Rapide NOMADS-MVP. [protocols.io https://protocols.io/view/surveillance-g-nomique-du-paludisme-par-la-m-thod-d64p9gvn](https://protocols.io/view/surveillance-g-nomique-du-paludisme-par-la-m-thod-d64p9gvn)

Created: March 31, 2025

Last Modified: April 01, 2025

Protocol Integer ID: 125807

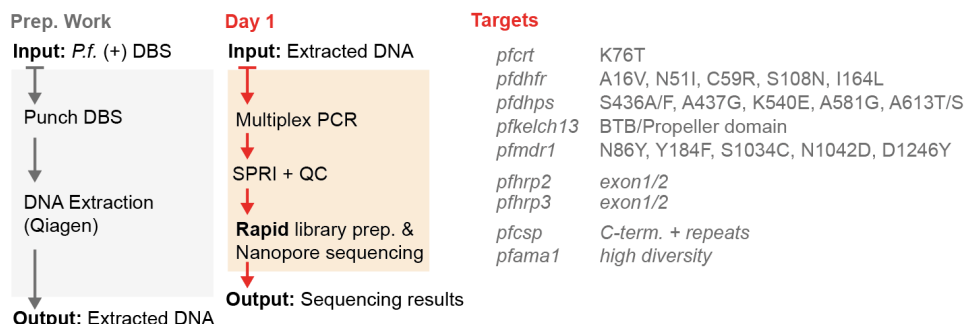
Disclaimer

Ce protocole est une version préliminaire et l'équipe NOMADS apprécie toute correction ou commentaire de la part des utilisateurs.

Abstract

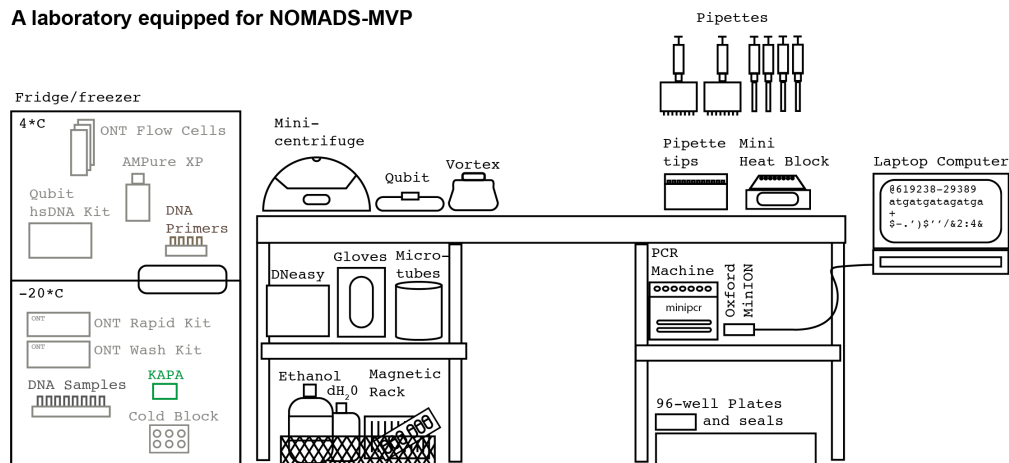
L'approche NOMADS Minimum Viable Panel (MVP) permet une surveillance génomique rapide du paludisme à *P. falciparum* grâce au séquençage par la méthode Nanopore. Cette méthode utilise des amplicons ciblant les principaux gènes de résistance aux médicaments antipaludiques (*pfprt*, *pfdfhr*, *pfdhps*, *pfkelch13*, *pfmdr1*), les antigènes des tests de diagnostic rapide (TDR) (*pfhrp2*, *pfhrp3*), un gène à haute diversité (*pfama1*) et la cible du vaccin RTS'S (*pfensp*). Il faut moins d'une journée pour passer de l'extraction d'ADN à la génération de données et les résultats peuvent être visualisés en temps réel à l'aide du tableau de bord *Nomadic* (<https://github.com/JasonAHendry/nomadic>).

NOMADS-MVP Approach



Le protocole utilise une seule PCR multiplexe à partir d'extrait d'ADN sans préamplification, combinée au codage rapide de l'ADN par le kit de barres-codes (SQK-RBK114.96) d'Oxford Nanopore Technologies (ONT) pour accélérer et simplifier la préparation de la librairie. La longueur médiane de lecture (séquence nucléotidique) est généralement comprise entre 400 et 600 pb, et plus de 80 échantillons peuvent être multiplexés en une seule analyse. Sur un ensemble d'échantillons de sang séché sur papier buvard (DBS) sur le terrain, le taux de réussite est modéré (>60 %) pour les échantillons avec une parasitémie >100 p/uL, et bon (>90 %) pour les échantillons avec une parasitémie >1000 p/uL. Le protocole a été validé pour la détection de polymorphisme mononucleotidique (SNP) dans des échantillons clonaux et la détection de la délétion hrp2/3.

A laboratory equipped for NOMADS-MVP



Materials

MVP Primers

Name	Sequence	Quantity to order (nmole)	Formulation
ama1-d2-18-ck_v43_F	CAACACGCATATCCAATAGACCA	25nm	STD
ama1-d2-18-ck_v43_R	TGATCCGAAGCACTCAATTCAA	25nm	STD
crt-k76_v27_F	AGCAAAAATGACGAGCGTTATAGA	25nm	STD
crt-k76_v27_R	AGCTTCGGTGTCGTTCTCTAAA	25nm	STD
csp-rtss-repeat_v4_F	TCGCAAACGTAATTAAATATTACAAAA	25nm	STD
csp-rtss-repeat_v4_R	CCTTATTCCAGGAATACCAGTGC	25nm	STD
dhfr-p51-p164_v19_F	CCATTTTTGTATTCCCAAATAGCTAGT	25nm	STD
dhfr-p51-p164_v19_R	TCCCTAGTACCATTAGCTTCCCA	25nm	STD
dhps-p436-p613_v55_F	TCCATTCTCATGTGTATACAACA	25nm	STD
dhps-p436-p613_v55_R	TGTTTAATCACATGTTTGCACTTTCC	25nm	STD
hrp2-exon2-complete_v26_F	TCGCTATCCCATAAATTACAAAACA	25nm	STD
hrp2-exon2-complete_v26_R	CCGTTTTTGCCTCCGTAATT	25nm	STD
hrp3-exon2-complete_v21_F	AGACAGTAGAAAAATCGCTATCCT	25nm	STD
hrp3-exon2-complete_v21_R	GCCGTTTTTGCCTCCGTAATT	25nm	STD
kelch13-cterm_v5_F	AAGGGAAAAATCATAACAATCAAGT	25nm	STD
kelch13-cterm_v5_R	GGAAGACATCATGTAACCAGAGA	25nm	STD
mdr1-p1034-p1246_v19_F	GCGGAGTTTTTGCATTTAGTTTCAG	25nm	STD
mdr1-p1034-p1246_v19_R	CCAATGTTGCATCTTCTCTTCCA	25nm	STD
mdr1-p86-p184_v26_F	CGTTTAAATGTTTACCTGCACAACA	25nm	STD
mdr1-p86-p184_v26_R	ACTTGCAACAGTTCTTATTCCCA	25nm	STD

MVP Multiplex PCR Reagents

Product	Order number	Vendor
KAPA HiFi HS RM (6.25ml)	07958935001 (KK2602)	Roche
Qubit 1X dsDNA HS Assay Kit	Q33231	Thermo Fisher Scientific
AMPure XP Beads	A63881	Beckman Coulter

Rapid Sequencing

Product	Order number	Vendor
Rapid sequencing DNA V14	SQK-RBK114.96	Oxford Nanopore
Flow Cell R.10	FLO-MIN114	Oxford Nanopore
Flow Cell Wash Kit	EXP-WSH004	Oxford Nanopore

Abbr.	Definition
MVP	Minimum Viable Panel
DNA	Deoxyribonucleic acid
PCR	Polymerase chain reaction

Abbr.	Definition
DBS	Dried blood spot
EB	Elution buffer
bp	Base pair
QC	Quality control
AMPure XP beads	Magnetic beads used for purification
RFU	Relative fluorescence units
ng	Nanogram
ul	microliter
min	Minutes
sec	Seconds

Plasticware

Plastics	Comment
1.5 ml Low Bind Tubes	Eppendorf
100 ml Reservoir	Needed in purification step
15ml or 50ml Falcon Tube	For ethanol preparation
96-well Plates	Ensure they fit your thermalcycler
96-well Plate Seals	
Strip Tubes	For aliquoting master mix
Qubit Tubes	

Information importante

1 Inclure des contrôles

Toujours inclure au moins un contrôle positif (souche de laboratoire connue) et un contrôle négatif (eau sans nucléase ou eau PCR grade) dans chaque cycle de séquençage.



2 Eviter les contaminations

Le séquençage de l'ADN est très sensible à la contamination.

Veuillez suivre les étapes suivantes pour éviter toute contamination pendant votre travail :

- Avant de commencer, nettoyez les surfaces avec de l'eau de Javel à 10 %, puis lavez-les avec de l'éthanol à 70 % (vous pouvez également utiliser de l'éthanol à 70 %, puis une solution comme DNA exitus).
- Aliquoter les réactifs de grand volume en plus petits volumes afin qu'ils ne soient pas utilisés pour plusieurs expériences. Par exemple, nous recommandons **fortement d'aliquoter le KAPA HiFi ReadyMix** (des aliquotes de 845 µl sont suffisantes pour des lots de 48 échantillons).
- Si possible, effectuez tous les travaux de pré-PCR dans un espace propre séparé.
- Changez toujours les embouts entre les échantillons.
- Centrifugez toujours les tubes ou les plaques avant de les ouvrir.
- Ne touchez jamais les réactifs ou les pipettes sans gants.



3 Sélectionner les échantillons appropriés pour le séquençage

Parasitémie : Nous avons traité plus de 500 taches de sang séché sur le terrain (DBS) avec ce protocole provenant de plusieurs pays et études à travers l'Afrique subsaharienne. En général, nous observons de très bons taux de réussite (>90 %) pour les échantillons avec une parasitémie >1000 p/uL ; et des taux de réussite modérés (>60 %) pour les échantillons avec une parasitémie >100 p/uL.

Extraction de l'ADN : Nous avons observé de meilleures performances pour les échantillons extraits avec les kits Qiagen, plutôt qu'avec Chelex.

Qualité : Il est important d'utiliser du papier filtre Whatman 3 ou équivalent pour les taches de sang séché (DBS). Extraire l'ADN rapidement après le prélèvement des DBS et le conserver à -20 °C est le meilleur moyen de maintenir la qualité de l'ADN. Les échantillons qui restent longtemps sous forme de DBS (> 6-12 mois) peuvent être moins performants.

4 Si vous travaillez dans une plaque à 96 puits :

Chaque ajout de réactif (par exemple, le master mix ou l'eau dans l'étape d'élution) peut d'abord être ajouté dans un tube à barrette de 8 puits, afin que vous puissiez utiliser une pipette multicanale pour ajouter les réactifs par colonne. Vérifiez toujours l'absorption et la libération du réactif dans chaque embout lorsque vous utilisez une pipette multicanale.



5 PCR MVP

Preparer les amorces individuelles :

Les amorces sont livrées lyophilisées et doivent être reconstituées à 100 uM dans de l'eau sans nucléase ou un faible tampon TE comme suit :

- Centrifuger toutes les amorces lyophilisées avant de les ouvrir.
- Sur chaque tube, vous trouverez des informations sur la **molarité, par exemple 24,8 nmol**. Vous devrez ajouter 248 ul d'eau sans nucléase ou de faible tampon TE pour obtenir une concentration de **100 uM**.

Attention: Attention : le volume nécessaire pour chaque amorce sera différent !

Exemple:

Pour l'amorce **csp-rtss-repeat_v4_F**,
26.7 nmol est marqué sur le tube.

Ajouter **267 ul** d'eau sans nuclease (PCR grade)

- Préparer toutes les amorces à une concentration de **100 uM**, bien les agiter au vortex et les centrifuger.

Preparer le pool d'amorces:

- Pour préparer le pool d'amorces, **combinez 7,5 ul des amorces dhps et 5 ul de chaque autre amorce (100 uM)** dans un nouveau tube. Votre volume total sera de **105 ul**.

Name	Sequence	Volume into Pool (ul)
ama1-d2-18-ck_v43_F	CAACACGCATATCCAATAGACCA	5
ama1-d2-18-ck_v43_R	TGATCCGAAGCACTCAATTCAA	5
crt-k76_v27_F	AGCAAAAATGACGAGCGTTATAGA	5
crt-k76_v27_R	AGCTTCGGTGTCGTTCTCTAAA	5
csp-rtss-repeat_v4_F	TCGCAAACGTAATTAAATATTCACA AA	5
csp-rtss-repeat_v4_R	CCTTATTCCAGGAATACCAGTGC	5
dhfr-p51-p164_v19_F	CCATTTTTGTATTCCCAAATAGCTA GT	5
dhfr-p51-p164_v19_R	TCCCTAGTACCATTAGCTTCCCA	5
hrp2-exon2- complete_v26_F	TCGCTATCCCATAAATTACAAAACA	5
hrp2-exon2- complete_v26_R	CCGTTTTTGCCTCCGTA CTT	5
hrp3-exon2- complete_v21_F	AGACAGTAGAAAAATCGCTATCCT	5
hrp3-exon2- complete_v21_R	GCCGTTTTTGCCTCCGTA CTT	5
kelch13-cterm_v5_F	AAGGGAAAATCATAACAATCAAG T	5
kelch13-cterm_v5_R	GGAAGACATCATGTAACCAGAGA	5
mdr1-p1034-p1246_v19_F	GCGGAGTTTTTGCATTTAGTTCAG	5



Name	Sequence	Volume into Pool (ul)
mdr1-p1034-p1246_v19_R	CCAATGTTGCATCTTCTCTTCCA	5
mdr1-p86-p184_v26_F	CGTTTAAATGTTTACCTGCACAAC A	5
mdr1-p86-p184_v26_R	ACTTGCAACAGTTCTTATTCCCA	5
dhps-p436-p613_v55_F	TCCATTCTCATGTGTATACAACA	7.5
dhps-p436-p613_v55_R	TGTTTAATCACATGTTTGCACTTTC C	7.5

- **Prendre 100 µl du pool d'amorces et ajouter 900 µl d'eau** sans nucléase ou de faible tampon TE pour obtenir une **dilution (solution) de travail de 10 µM** et bien mélanger.
- Préparer 4 aliquotes du pool d'amorces de 250 µl chacune.
- Conserver 3 aliquotes à -20°C et conserver l'aliquote de travail à 4°C.

Préparer le programme d'amplification PCR

Step	Temp (°C)	Time	No. of Cycles
Prepare Block	95	Forever	1
Initial Denaturation	95	3 min	1
Denaturation	98	20 sec	35
Extension	60	3 min	
Final Extension	60	10 min	1
Hold	8	Forever	1

La durée totale est d'environ 2 heures et 28 minutes.

Préparer les échantillons

- Transférer 8 µl d'extrait d'ADN de chaque échantillon dans un puits unique d'une plaque à 96 puits.
- Couvrir la plaque pendant la préparation du mélange réactionnel (master mix).

Préparer le mélange réactionnel (master mix)

- Avant de préparer le master mix, lancer le programme PCR pour préchauffer le bloc à 95 °C.
- Préparer le master mix comme suit sur portoir réfrigéré ou de la glace:

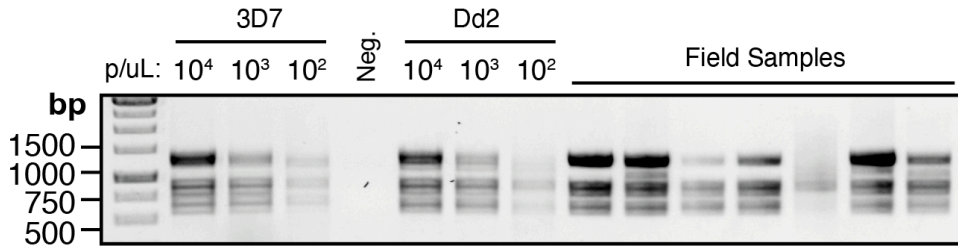
Reagent	Vol. per sample (ul)	Vol. per 48 sample (ul) [+10% excess]
KAPA ReadyMix 2X	15.5	818
MVP primer pool (10uM)	1.5	79
Total	17	897

- Mélanger le master mix en pipettant.
- Transférez 17 ul de master mix dans chaque échantillon. Lorsque vous préparez de nombreux échantillons, divisez votre master mix en aliquotes dans un tube à barrette de 8 puits, puis transférez le master mix dans les échantillons à l'aide d'une pipette multicanale pour améliorer l'homogénéité.
- Mélanger bien en pipettant, sceller la plaque et centrifuger.

- Placez la plaque dans le thermocycleur préchauffé et appuyez sur « Resume » ou « Skip Step » pour lancer la PCR.

Contrôle qualité par électrophorèse

- Après la PCR, migrer 1 à 2 µl de chaque produit de PCR sur un gel d'agarose à 0,66 % avec un marqueur de poids moléculaire de 1 kb.
- Vos résultats devraient ressembler à la figure ci-dessous:



Exemple de gel d'agarose de NOMADS-MVP. Les témoins positifs sont présentés à trois niveaux de parasitémie. Le témoin négatif est de l'eau sans nucléase. Sept échantillons de terrain sont présentés ; l'un d'entre eux a échoué.

Purification Post-PCR des amplicons

- Assurez-vous que vos billes AMPure XP sont à température ambiante ! Mélangez les billes AMPure XP au vortex pendant au moins 30 secondes pour vous assurer qu'elles sont en suspension avant de les pipeter ! Préparez une nouvelle solution d'éthanol à 80 % à chaque fois.**

# of samples	Vol. Ethanol	Vol. Water	Total vol.
24	12 ml	3 ml	15 ml
48	20 ml	5 ml	25 ml
96	36 ml	9 ml	45 ml

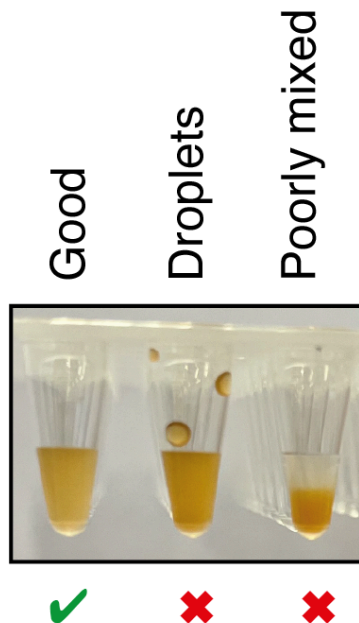
Instructions pour la préparation de l'éthanol à 80 %. Un peu d'excédent est inclus pour l'utilisation avec le réservoir.

Purification Post-PCR des amplicons

- Aliquoter les billes AMPure XP mélangées dans un tube à barette de 8 puits puis distribuer à l'aide d'une pipette multicanale pour améliorer l'homogénéité.
 - Ajouter 12 µl de billes AMPure XP aux amplicons (le ratio est de 0.5X)
 - Mélangez bien à l'aide d'une pipette. Vérifiez visuellement que les billes sont bien mélangées dans toute la solution (voir l'image ci-dessous).
 - Incuber pendant 5 minutes à température ambiante (pas sur le portoir magnétique).
 - Incuber pendant 5 à 8 minutes sur le portoir magnétique
 - Retirez le surnageant en laissant environ 5 µL. Veillez à ne pas transférer de billes.
 - Tout en maintenant la plaque sur le portoir magnétique, laver les billes en ajoutant 175 µl d'éthanol à 80 %. (Pour une plaque à 96 puits, ajouter l'éthanol dans un réservoir

puis distribuer avec une pipette multicanale).

- Attendre pendant 30 secondes.
- Retirer et jeter le surnageant.
- Répéter le lavage à l'éthanol en ajoutant 175 µl supplémentaires d'éthanol à 80 %, en laissant agir pendant 30 secondes et en éliminant le surnageant.
- Centrifuger brièvement les échantillons, puis remettez-les sur le portoir magnétique et éliminez tout résidu d'éthanol. Assurez-vous que tout l'éthanol a été éliminé.
- Séchez les billes à l'air jusqu'à ce qu'elles semblent sèches, par exemple 30 secondes à 1 minute.
- Remettre les billes en suspension dans 15 µl d'eau sans nucléase en pipettant.
- Incuber 3 minutes à température ambiante pour que l'ADN soit libéré des billes.
- Remettre les échantillons sur le portoir magnétique pendant 2 minutes ou jusqu'à ce que les billes se soient agglomérées et que la solution soit claire.
- Transférer 14 µl de surnageant dans une nouvelle plaque à 96 puits.
- Quantifier l'ADN purifié à l'aide du Qubit DNA assay kit en utilisant 1 µl d'ADN purifié. Une bonne concentration est >30 ng/ul ou plus.
- Point d'arrêt: il est possible d'arrêter l'expérience à cette étape. Conserver l'ADN purifié à -20 °C ou +4 °C.



- **Exemple de purification d'ADN aux billes.** Dans le puits de gauche, les billes sont correctement mélangées. Dans le puits du milieu, il y a des gouttelettes ; la plaque doit être centrifugée. Dans le puits de droite, il faut davantage pipeter et mélanger.

Quantification de l'ADN avec Qubit

- 8 Sortir tous les réactifs Qubit (une aliquote du colorant et les standards) et laisser incuber à température ambiante pendant 20 à 30 minutes.

Toujours conserver le réactif Qubit (colorant) à l'abri de la lumière.

- Préparer un tube Qubit par échantillon et deux tubes Qubit pour les standards et étiqueter les couvercles des tubes. Utilisez toujours des tubes de dosage Qubit (Q32856) pour la quantification.
- Pour chacun des deux standards, répartir 190 µl de réactif Qubit dans des tubes étiquetés
- Pour les tubes d'échantillons, aliquotez 199 µl de réactif Qubit par échantillon.
- Le volume final dans chaque tube doit être de 200 µl (après ajout des échantillons ou des standards)
- Ajoutez 10 µl de chaque standard dans les tubes préparés. Veillez à ajouter 10 µl, sinon vos lectures seront incorrectes !
- Ajoutez 1 µl de votre échantillon dans chaque tube.
- Mélanger au vortex brièvement tous les tubes et incuber pendant 2 minutes à température ambiante (à l'abri de la lumière).
- Assurez-vous qu'il n'y a pas de bulles d'air dans le mélange
- Après incubation, mesurer la concentration des deux standards (en suivant les instructions de l'appareil)
- Les valeurs approximatives des standards pourraient être de l'ordre de :
 - Standard I : ~ 100 RFU
 - Standard II: ~ 45000 RFU
- Mesurer et noter la concentration des échantillons.
- La concentration optimale en utilisant Qubit DNA assay avec 1 µl d'ADN purifié est >30 ng/µl ou plus.

Codage rapide des échantillons

9 **Il s'agit d'une version simplifiée du protocole original de séquençage** . Il est fortement recommandé de se référer au protocole original sur le site web pour des instructions plus détaillées, en particulier sur la vérification et le chargement des flow cells.



Remarque : soyez très prudent lorsque vous retirez la couverture (film adhésif) de la plaque de code-barres rapides ! Vous devez éviter la contamination croisée des codes-barres.

- 10
- Transférer environ 50 à 600 ng par échantillon dans une nouvelle plaque, dans un volume total ne dépassant pas 10 µl.
 - Si possible, utilisez des volumes égaux pour tous les échantillons afin d'éviter toute contamination. Compléter jusqu'à 10 µl avec de l'eau sans nucléase.
 - Centrifuger brièvement la plaque de codes-barres rapides et placez-la sur de la glace. Retirez délicatement la couverture.
 - Ajoutez 1 µl du code-barres rapides à chaque échantillon. Utilisez une pipette multicanale et ajoutez les codes-barres par colonne, de sorte que chaque échantillon ait un code-barres différent. **Vérifiez chaque embout de pipette pour vous assurer que les codes-barres sont bien ajoutés ! Très important !**
 - Mélanger soigneusement à l'aide d'une pipette et centrifuger brièvement.
 - Incuber la plaque dans le thermocycleur suivant le programme ci-dessous :

Step	Temp. (°C)	Time
Prepare block	30	Forever
Tagmentation	30	2 min
Inactivation	80	2 min
Hold	8	Forever

11 **Pooler tous les échantillons déjà munis de codes-barres et purifier le pool**



- Centrifuger brièvement la plaque pour recueillir le liquide au fond.
- Pipetter 5 µl de chaque échantillon à code-barres dans un tube Low Bind de 1,5 ml
- Avec une pipette multicanale, prélevez d'abord 5 µl de chaque échantillon (de chaque colonne de la plaque) dans un tube à barettes PCR.
- Transférer enfin du tube à barettes PCR dans un tube propre de 1,5 ml. Il est fortement recommandé de **mesurer à nouveau le volume total de votre pool à l'aide d'une pipette monocanale afin d'ajouter le volume correct de billes AMPure XP lors de l'étape suivante.**
- Conservez les échantillons restants munis de codes-barres à 4 °C en guise de sauvegarde.

12 **Purification post-pooling**

Assurez-vous que vos billes AMPure XP sont à température ambiante ! Mélangez les billes AMPure XP au vortex pendant au moins 30 secondes pour vous assurer qu'elles sont en suspension avant de les pipeter ! Préparez une nouvelle solution d'éthanol à 80 % à chaque fois.

# of samples	Vol. Ethanol	Vol. Water	Total vol.
24	0.8 ml	0.2 ml	1 ml
48	0.8 ml	0.2 ml	1 ml
96	2.4 ml	0.6 ml	3 ml

Directives pour la préparation de l'éthanol à 80 %.

- ## 13
- Effectuer la purification avec un ratio de 0.5X de billes AMPure XP.
 - Pour un pool de 150 µl, ajoutez 75 µl de billes AMPure XP agitées au vortex. **(vérifiez le volume de votre pool avec une pipette monocal, pour ajouter le bon volume de billes AMPure XP).**
 - Incuber 5 minutes à température ambiante.
 - Préparer de l'éthanol à 80 % frais selon le tableau ci-dessus.
 - Placer le pool sur un portoir magnétique pendant 5 à 8 minutes jusqu'à ce que la solution soit claire. Retirer le surnageant.
 - Garder le tube sur le portoir magnétique et laver les billes en ajoutant de l'éthanol 80 % fraîchement préparée jusqu'à ce que les **billes soient complètement recouvertes d'éthanol**, sans déplacer le culot. En général, 500 µl d'éthanol suffisent.
 - Retirer le surnageant





- Répéter l'étape précédente
- Centrifuger brièvement le tube et le replacer sur le portoir magnétique. Pipeter tout résidu d'éthanol. Laisser sécher à l'air ambiant pendant 1 minute.
- Retirer le tube du portoir magnétique et remettre le culot en suspension dans 15 µl de tampon d'élution ou d'eau sans nuclease. Si vous avez plus de 48 échantillons en pool, vous pouvez augmenter le volume d'élution, par exemple à 30 µl.
- Incuber pendant 8 minute à température ambiante.
- Incuber sur le portoir magnétique pendant 1 minute jusqu'à ce que l'eluât soit clair.
- Retirer et conserver 14 µl d'eluât dans un nouveau tube. Pour un nombre d'échantillons plus élevé >48, l'élution peut être effectuée dans 30 µl.
- Utilisez 1 µl d'eluât pour réaliser une dilution 1:10 dans l'eau sans nucléase. Quantifiez 2 µl de la dilution 1:10 avec Qubit. La concentration de votre pool non dilué doit être >50 ng/µl.
- Transférer environ 800 ng du pool dans un nouveau tube avec un volume total de 11 µl . Si nécessaire, compléter jusqu'à 11 µl avec un tampon d'elution (EB).

14 **Ligature rapide des adaptateurs**

Utilisez toujours une dilution fraîchement préparée de l'adaptateur rapide (RA). N'utilisez pas l'adaptateur dilué pendant plusieurs jours.

- Mélanger l'adaptateur rapide (RA) par pipetage et le tampon d'adaptateur (ADB) au vortex.
- Dans un nouveau tube Eppendorf DNA LoBind de 1,5 ml, diluer l'adaptateur rapide (RA) comme suit et mélanger en pipettant.

Reagent
1.5 µl Rapid Adapter (RA)
3.5 µl Adapter Buffer (ADB)

- Ajouter 1 µl de l'adaptateur rapide dilué à l'ADN portant un code-barres.
- Mélangez doucement en tapotant le tube, puis centrifuger brièvement. **Attention! ne pas agiter aux vortex**
- Incuber la réaction pendant 5 minutes à température ambiante.

Amorçage et chargement de la flow cell

- 15
- Préparer le mélange d'amorçage en combinant les réactifs suivants dans un nouveau tube.

Volume	Reagent
1170 µl	Flow Cell Flush (FCF)
30 µl	Flow Cell Tether (FCT)

- Mélanger en retournant le tube et pipeter le mélange à température ambiante.
- Ouvrez le port d'amorçage (Priming port), réglez une pipette de 1000 µl sur 200 µl, faites défiler vers le haut jusqu'à ce que vous puissiez voir un petit volume de tampon entrer dans l'embout de la pipette. (Pour éliminer l'air)



- Pipeter et charger lentement 800 µl du mélange d'amorçage (FCF+FCT) dans la flow cell par le port d'amorçage . **Évitez l'introduction de bulles d'air !**
- Attendre 5 minutes.
- Pendant ce temps, préparez comme indiqué dans le tableau ci-dessous la librairie pour le chargement :

Volume	Reagent
37.5 ul	Sequencing Buffer (SB)
25.5 ul	Library Beads (LIB) mixed immediately before use
12 ul	DNA Library (adapter ligated pool)

- Soulevez doucement le capuchon du port d'échantillonnage (SpotON sample port) pour accéder à ce dernier.
- Chargez lentement 200 µl du mélange d'amorçage dans le port d'amorçage de la flow cell (et non dans le port d'échantillonnage), en évitant l'introduction de bulles d'air.
- Ajoutez 75 µl de la librairie préparée à la Flow Cell par le port d'échantillonnage, goutte à goutte. Assurez-vous que chaque goutte s'écoule dans le port avant d'ajouter la suivante.
- Remettez doucement en place le capuchon du port d'échantillonnage et fermez le port d'amorçage .
- Demarrer le sequencage