

OCT 12, 2023

OPEN ACCESS



DOI:
dx.doi.org/10.17504/protocols.io.81wgbxrynlpk/v1

Protocol Citation: Alex Shaw, Manasi Majumdar, Catherine Troman, Erika Bujaki, Joyce Akello, Aine.OToole, shannon.fitz, c.ansley, rachel.colquhoun, arshady, khurshida, alammu, Andrew Rambaut, Javier Martin, Nick Grassly 2023. Détection directe du poliovirus par séquençage nanopore V2. **protocols.io** <https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.81wgbxrynlpk/v1>

License: This is an open access protocol distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited

🌐 Détection directe du poliovirus par séquençage nanopore V2

Manasi

Erika

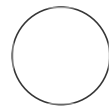
Alex Shaw¹, Majumdar², Catherine Troman¹, Bujaki², Joyce Akello¹, Aine.OToole³, shannon.fitz¹, c.ansley³, rachel.colquhoun³, arshady⁴, khurshida⁴, alammu⁴, Andrew Rambaut³, Javier Martin², Nick Grassly¹

¹Imperial College London;

²Medicines and Healthcare products Regulatory Agency;

³University of Edinburgh; ⁴National Institute of Health Islamabad, Pakistan

Poliovirus Sequencing Consortium



shannon.fitz

ABSTRACT

ABSTRACT

Ce protocole est une mise à jour du protocole décrit dans l'article "Rapid and sensitive direct detection and identification of poliovirus from stool and environmental surveillance samples using nanopore sequencing" par Shaw et al dans le Journal of Clinical Microbiology (2020), DOI : 10.1128/JCM.00920-20 et est communément connu sous le nom de détection directe du poliovirus par séquençage des nanopores (DDNS). Le protocole vise à amplifier la région VP1 du poliovirus avec une PCR nichée utilisant des amorces panEV suivie d'une amplification de la séquence VP1 à l'aide des amorces Q8/Y7. Nous utilisons des amorces à code-barres car cela simplifie grandement le processus ultérieur de préparation de la bibliothèque. Les séquences d'amorces pour les amorces panEV, les amorces Q8/Y7 et les amorces Q8/Y7 à code-barres se trouvent dans l'ensemble de données S1 de la publication.

Ce protocole devrait être utilisé avec les réactifs de séquençage chimique Oxford Nanopore kit14 et le séquenceur MinION Mk1B, MinION Mk1C ou GridION

AVANT DE COMMENCER

Ce protocole décrit l'amplification de la séquence VP1, l'attribution des code-barres aux échantillons, et la préparation de la bibliothèque. Nous prévoyons que les

Protocol status: Working
We use this protocol and it's working

Created: Sep 12, 2023

Last Modified: Oct 12, 2023

PROTOCOL integer ID:
87681

Funders
Acknowledgement:
Bill and Melinda Gates
Foundation

utilisateurs auront effectué une extraction d'ARN avant ce protocole pour extraire l'ARN du poliovirus. Nous recommandons le kit Roche High Pure Viral RNA (avec protéinase K ajoutée), le QIAamp Viral RNA Mini Kit ou le MagMAX Viral RNA Isolation Kit pour ce processus.

Amorces VP1 à code-barres :

Pour un séquençage complet dans des plaques à 96 puits, nous recommandons l'achat et l'assemblage d'une plaque d'amorce à 96 puits avec 10 µM d'amorce Y7 à code-barres et 10 µM d'amorce Q8 à code-barres dans chaque puits. Chaque puits contient des amorces Q8 et Y7 avec le même code-barres unique, par exemple A1 = Y7 avec code-barres 1 et Q8 avec code-barres 1, A2 = Y7 avec code-barres 2 et Q8 avec code-barres 2, etc.

L'ensemble complet de 96 séquences d'amorces codées à barres est présenté dans Dataset_S1 de Shaw et al, 2020

GUIDELINES

Les étapes 4 et suivantes sont basées sur les protocoles d'Oxford Nanopore Technologies.

MATERIALS

Matériel nécessaire:

Pipettes P2, P10, P20, P100, P200, P1000
Pointes de pipettes P2, P10, P20, P100, P200, P1000
Tubes Eppendorf DNA LoBind de 1,5 ml
Thermocycleur
Tubes/barrettes/plaque PCR à paroi mince de 0,2 ml
Microcentrifugeuse
Mélangeur de vortex
Support magnétique
Équipement d'électrophorèse sur gel ou TapeStation
Qubit Fluoromètre et tubes
Oxford Nanopore MinION Mk1B ou Mk1C

Réactifs nécessaires :

Système de RT-PCR « SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum™ Taq DNA Polymerase » (ThermoFisher, 12574026)
DreamTaq 2x PCR Mastermix (NEB, K1071 ou K1072)
Billes Agencourt AMPure XP
Kit de séquençage de ligation (Oxford Nanopore, SQK-LSK114)
Module de réparation/dA-tailing NEBNext Ultra II Enp (NEB, E7546)
Module de ligation rapide NEBNext (NEB, E6056)
BSA ultra pure 50mg/ml (Invitrogen, AM2616)
Éthanol à 80 % fraîchement préparé dans de l'eau sans nucléase
Eau sans nucléase
Kit « Qubit Broad Range dsDNA »

Préparation d'ADN - Protocole pour l'amplification VP1

1 Synthèse de cADN à l'aide du mélange réactionnel Superscript III One pot et des amorces PanEV

1.1 Préparez un Master Mix en utilisant les volumes de réaction comme détaillé ci-dessous:

Réactif	1 Reaction (uL)
2x Master Mix	12.5 uL
SSIII Platinum Taq mix	1 uL
L'amorce antisens (10 µM)	1 uL
L'eau sans nucléase	4.5 uL
Volume totale	19 uL

1.2 Agiter brièvement au vortex et centrifuger. Ajouter 19 µL de master mix à chaque tube PCR et 5 µL d'ARN élué.

1.3 Ajouter 19 uL de Master Mix à un autre tube PCR avec 5 uL d'eau sans nucléase pour fonctionné comme contrôle negatif.

1.4 Si vous utilisez un contrôle positif, ajoutez 19 ul de master mix à un autre tube PCR avec 5 ul de l'ARN du contrôle positif .

1.5 Incuber à 50 °C pendant 30 minutes.

1.6 Ajouter 1 µL de l'amorce sens à chacun des tubes.

1.7 Amplifiez en utilisant les conditions de cycle suivantes:

Cycle	Étape	Température °C	Temps
1	Dénaturation initiale	94	2 minutes

Cycle	Étape	Température °C	Temps
42	Dénaturation	94	15 secondes
	Recuit	55	30 secondes
	Extension	68	4 minutes 30 secondes
1	Extension finale	68	5 minutes
-	Maintenir	10	-

2 Amplification VP1 à code-barres avec DreamTaq

- 2.1** Préparez un master mix en utilisant les volumes de réaction comme détaillé ci-dessous dans un 1.5ml Tube Eppendorf Lobind:

Reactifs	1 Reaction (uL)
DreamTaq 2x master mix	12.5
L'eau	8.5
Volume total	21

2.2

Brièvement agiter au vortex et centrifuger le master mix. Transférer une partie aliquote de 21 µL dans chaque tube PCR.

2.3

Ajouter 2 µL d'amorces VP1 sens et antisens prémélangées, en veillant à utiliser un code-barres différent pour chaque puit.

2.4

Ajouter 2 µL de produit panEV RT-PCR.

2.5

Amplifier en utilisant les conditions de cycle suivantes:

Cycle	Étape	Température °C	Temps
1	Dénaturation initiale	95	2 minutes
35	Dénaturation	95	30 secondes
	Recuit	55	30 secondes
	Extension	72	1 minute
1	Extension finale	72	10 minutes
-	Maintenir	10	-

2.6

Confirmation PCR: vérifiez un ensemble représentatif d'échantillons sur un gel ou sur le TapeStation pour confirmer que le PCR a réussi.

3 Regroupement et séquençage de cADN amplifié sur MinION

3.1 Regroupe l'ADN

Cette section a été adaptée pour utiliser même des volumes de mise en commun afin d'éviter les étapes de quantification chronophages. Une méthode alternative à celle présentée ci-dessous consiste à effectuer un nettoyage de billes AMPure pour chaque échantillon avec un rapport de billes de 1: 1, à quantifier et à créer un pool équimolaire avec un total de 1000 ug d'ADN.

- Regroupez 2 ul de chaque produit de PCR niché (ou plus si moins d'échantillons) dans un tube LoBind de 1,5 ml. Enregistrer le volume total.
- Préparez les billes AMPure XP pour utilisation ; remettre en suspension au vortex.
- Ajouter un volume de billes AMPure XP remis en suspension égal à celui du pool dans le tube de 1,5 ml.
- Incuber sur un rotateur pendant 5 minutes à température ambiante.
- Préparez 2 ml d'éthanol frais à 80% dans de l'eau sans nucléase.
- Centrifugez sur un échantillon et culotez sur un aimant. Gardez le tube sur l'aimant et pipettez le surnageant.
- Gardez sur l'aimant, lavez les billes avec 200 uL d'éthanol à 80 % fraîchement préparé, ou suffisamment pour recouvrir le culot, sans perturber le culot. Retirez l'éthanol à 80 % à

l'aide d'une pipette et jetez-le. Répéter.

- Centrifugez et replacez le tube sur l'aimant. Pipeter tout éthanol résiduel. Laisser sécher à l'air pendant environ 30 secondes.
- Retirer le tube de l'étagère magnétique et remettre le culot en suspension dans 51 µl d'eau sans nucléase. Incuber pendant 2 minutes à température ambiante.
- Peler les billes sur l'aimant jusqu'à ce que l'éluat soit clair et incolore.
- Retirez et conservez 50 µL de l'éluat (la bibliothèque) dans un tube PCR propre de 0,2 ml.

Cette bibliothèque regroupée est maintenant prête à être adaptée pour le séquençage des nanopores.

4 End-prep et dA-tailing

4.1 Effectuez la réparation finale et la dA-tailing du pool d'ADN en ajoutant les réactifs suivants au tube de 0,2 ml:

A
50 µl de pool d'ADN
7 µl de tampon de réaction Ultra II End-prep
3 µl de mélange d'enzymes de préparation finale Ultra II

4.2 Mélangez doucement en tapotant le tube et centrifugez.

- Incuber 5 minutes à 20°C et 5 minutes à 65°C avec une étape de refroidissement à 10 °C à l'aide du thermocycleur.
- Pendant ce temps, vous pouvez retirer votre flowcell à circulation du réfrigérateur pour lui permettre de se réchauffer à température ambiante. Assurez-vous que la flowcell est FLO-MIN114/R10.4.1
- Vous pouvez également commencer à décongeler les réactifs à l'étape 3.
- Préparez les billes AMPure XP pour utilisation ; remettre en suspension au vortex.
- Transférer l'échantillon dans un tube Eppendorf DNA LoBind de 1,5 mL.
- Ajouter 60 µl de billes AMPure XP remises en suspension à la réaction de préparation finale et mélanger en agitant le tube.
- Incuber sur un rotateur pendant 5 minutes à température ambiante.
- Faites tourner l'échantillon et remettre sur l'étagère magnétique. Gardez le tube sur l'aimant et pipettez le surnageant.

- Gardez sur l'étagère magnétique, lavez les billes avec 200 uL d'éthanol à 80 % sans perturber la culot. Retirer l'éthanol à l'aide d'une pipette et jeter. Répéter.
- Centrifugez et replacez le tube sur l'étagère magnétique. Pipeter tout éthanol résiduel. Laisser sécher à l'air pendant environ 30 secondes.
- Retirer le tube du portoir magnétique et remettre le culot en suspension dans 61 ul d'eau sans nuclease. Incuber 2 minutes à température ambiante.
- Peler les billes sur l'aimant jusqu'à ce que l'éluat soit clair et incolore. Retirer et conserver l'éluat dans un tube Eppendorf DNA LoBind propre de 1,5 mL.

5 Ligature de l'adaptateur

- ### 5.1
- Faites tourner et décongelez la ligation adaptor (LA) et la ligase T4 rapide (Quick T4 ligase, NEB, E6506) sur de la glace.
 - Décongeler le tampon de ligation (Ligation Buffer - LNB) à température ambiante, centrifuger, mélanger par pipetage. Placer sur de la glace. Décongeler le tampon d'élution (Elution Buffer - EB) et un tube de tampon de fragments courts (Short Fragment Buffer - SFB) à température ambiante, mélanger au vortex, centrifuger. Placer sur de la glace.

Préparez le mélange réactionnel suivant :

A	B
60 ul	ADN
25 ul	Tampon de ligation (LNB)
10 ul	NEBNext Rapide T4 ADN (Quick T4)
5 ul	Adaptateur de ligation (LA)

- Mélanger doucement en tapotant le tube et centrifuger.
- Incuber la réaction pendant 10 minutes à température ambiante. Pendant ce temps, passez à l'étape 4.

6 Vérifiez votre Flow Cell

- ### 6.1
- Configurez le minion, la Flow Cell et l'ordinateur hôte. Une fois branché avec succès, vous verrez une lumière et entendrez le ventilateur.

- Ouvrez le MinKNOW GUI à partir de l'icône du bureau.
- Branchez le Minion sur l'ordinateur et attendez de voir le MinION s'afficher à l'écran avant d'insérer la Flow Cell.
- Sélectionnez l'onglet "Start"
- Sélectionnez "Check Flowcell"
- Vérifiez le nombre de pores actifs disponibles pour l'expérience, indiqué dans le panneau de message ou dans les notifications lorsque la vérification est terminée.
- Enregistrez le nombre de pores disponibles dans la feuille QC.

7 Liaison de billes AMPure XP

- ### 7.1
- Préparez les billes AMPure XP pour utilisation ; remettre en suspension au vortex.
 - Une fois les 10 minutes pour la ligature de l'adaptateur sont finis, ajouter 40 µl de billes AMPure XP remises en suspension à les échantillons et mélanger par pipetage. Incuber sur un rotateur pendant 5 minutes à température ambiante. Placer sur une étagère magnétique, laisser les billes se sédimenter et pipeter le surnageant.
 - Ajouter 250 µl de SFB aux billes. Fermez le couvercle du tube et resuspendre les perles en effleurant le tube. Remettez le tube sur l'étagère magnétique, laissez les billes se granuler et pipettez le surnageant. Répéter.
 - Faites tourner le tube et remettez-le sur l'étagère magnétique. Pipeter le surnageant résiduel et sécher à l'air pendant environ 30 secondes.
 - Retirer le tube de l'étagère magnétique et remettre en suspension le culot dans 15 µl de tampon d'élution. Incuber 10 minutes à température ambiante.
 - Peler les billes sur l'étagère magnétique jusqu'à ce que l'éluat soit clair et incolore.
 - Retirez et conservez l'éluat qui contient la librairie d'ADN dans un nouveau tube Eppendorf DNA Lobind de 1,5 ml.
 - Jeter les billes que vous avez utiliser.

8 Quantification du librairie (facultatif pour les tests de routine des selles)

- ### 8.1
- Quantifiez 1 µl de votre librairie adaptée à l'aide d'un Qubit ou d'une tapestation. Diluer une aliquote du librairie dans le tampon d'élution (EB) pour permettre le pipetage de 20 fmol (16 ng) pour la librairie de séquençage finale.
 - Par exemple: si votre librairie est de 100 ng/µl, diluer 1:10 pour utiliser 1,6 µl dans le séquençage.
 - Ajoutez 20 fmol de votre librairie dans un tube Eppendorf propre de 1,5 ml ou un tube PCR de 0,2 ml et augmentez le volume jusqu'à 12 µl en utilisant le tampon d'élution. Cela peut

être stocké sur de la glace jusqu'à ce qu'il soit prêt pour le chargement.

- La librairie non diluée restante peut être stockée à 4°C pendant une semaine maximum, ou à -80°C pour un stockage à plus long terme.

9 Liste de contrôle avant le séquençage

- ### 9.1
- Librairie préparée sur glace
 - Ordinateur configuré pour exécuter MinKNOW
 - Dispositif de séquençage connecté à un ordinateur avec la flowcell insérée
 - Vérification de la flowcell terminée

10 Amorçage et chargement de la Flowcell SpotON

- ### 10.1
- Décongeler le tampon de séquençage (SB), les billes de bibliothèque (LIB), le Flow Cell Tether (FCT) et un tube de Flow Cell Flush (FCF) à température ambiante et remettre dans la glace une fois décongelés.
 - Mélangez les tubes de tampon de séquençage (SB), de Flow Cell Flush (FCF) et de Flow Cell Tether (FCT) au vortex, centrifugez et remettez dans la glace.
 - Préparez le mélange d'amorçage en ajoutant le FCT et le BSA au tube FCF :

A	B
1170 ul	Flow Cell Flush
30 ul	Flow Cell Tether
5 ul	BSA (50 mg/mL)

- Ouvrez le couvercle du dispositif de séquençage nanopore et faites glisser le couvercle du port d'amorçage de la Flow Cell dans le sens des aiguilles d'une montre afin que le port d'amorçage soit visible.
- Après avoir ouvert le port d'amorçage, vérifiez s'il y a de l'air sous le port. Retirez un petit volume pour éliminer les bulles en insérant une pointe de pipette P1000 dans le port d'amorçage et en faisant tourner le piston de la pipette pour augmenter lentement le volume et retirer ~ 20 µL. (Ne retirez pas plus de 20 à 30 µL et assurez-vous que le réseau de pores est recouvert de tampon à tout moment).
- Vérifiez visuellement qu'il y a un tampon continu du port d'amorçage à travers le réseau sensoriel.
- Chargez 800 uL du mélange d'amorçage dans la cellule à écoulement via le port

d'amorçage, en évitant l'introduction de bulles d'air. Attendez 5 minutes.

- Bien mélanger le contenu du tube LBII par pipetage.
- Préparez la librairie pour le chargement comme suit en ajoutant la SB et la LIB à la librairie 20 fmol préparée :

A	B
37.5 ul	Sequencing Buffer (SB)
25.5 ul	Library Beads (LIB), mélangé immédiatement avant utilisation
12 ul	Librairie d'ADN
75 ul totale	

- Soulevez doucement le couvercle du port d'échantillonnage SpotON pour le rendre accessible
- Avec le port d'amorçage et les ports d'échantillonnage ouverts, chargez 200 uL du mélange d'amorçage dans la Flow Cell via le port d'amorçage (et **non** le port d'échantillon SpotON), en évitant l'introduction de bulles d'air.
- Mélangez délicatement la librairie préparée en la pipetant de haut en bas juste avant le chargement.
- Ajouter goutte à goutte 75 uL d'échantillon à la Flow Cell via le port d'échantillon SpotON. Assurez-vous que chaque goutte coule dans le port avant d'ajouter la suivante.
- Remplacez délicatement le couvercle du port d'échantillonnage SpotON, en vous assurant que le bouchon pénètre dans le port SpotON, fermez le port d'amorçage et remplacez le couvercle MinION.

11 Commencer le cycle de séquençage

11.1

- Ouvrez MinKNOW GUI.
- Attendez que MinKNOW GUI s'ouvre
- Connectez-vous avec votre compte nanopore ou en tant qu'invité
- Cliquez sur le tableau "Start" sur le GUI
- Cliquez sur "Start Sequencing"
- Saisissez le nom de l'expérience
- Cliquez sur "Continue to kit selection"
- Sélectionnez le "Ligation sequencing kit, SQK-LSK114"
- Pour le démultiplexage, sélectionnez "EXP-PBC096 " et pour les codes-barres aux deux extrémités (« Barcode both ends »). Le démultiplexage peut devoir être effectué séparément après l'exécution via l'onglet "Analysis".
- Cliquez sur "Continue to run options"

- Réglez la durée d'exécution sur 4 heures pour une analyse typique.
- Dans les options de démultiplexage, sélectionnez High Accuracy basecalling.
- Assurez-vous que le code-barres est activé, et dans les options avancées, vous sélectionnez d'avoir le code-barres aux deux extrémités
- Cliquez sur "Skip to final review"
- Cliquez sur "Start"

12 Progression du script du protocole MinKNOW

- ### 12.1
- Vérifiez que le nombre de pores actifs signalés lors de l'analyse initiale de la Flow Cell est similaire (dans une fourchette de 10 à 15 %) à ceux signalés à la fin de la vérification de la Flow Cell.
 - S'il y a une réduction significative de ces nombres, assurez-vous que la Flow Cell est insérée correctement et recommencer l'analyse.
 - Vérifiez que la température du radiateur est d'environ 35°C.
 - Surveiller l'évolution de l'histogramme de longueur de lecture.
 - Vérifiez l'occupation des pores en regardant le panneau en haut des vues Status ou Physical Layout.
 - Si vous souhaitez que votre analyse progresse plus longtemps, vous pouvez arrêter l'analyse de séquençage et redémarrer avec une durée plus longue. Vous pouvez choisir de rejoindre une expérience existante, de sorte que les sorties se trouvent dans le même répertoire initial.

13 Démultiplexage

- ### 13.1
- Maintenant, ONT n'offre pas le démultiplexage des codes-barres PCR en temps réel. Cela devrait être disponible dans une future mise à jour de MinKNOW
 - Pour démultiplexer les lectures après l'exécution, accédez à l'onglet Analyse de MinKNOW
 - Sélectionnez le code-barres
 - Suivez les étapes pour sélectionner le run que vous souhaitez démultiplexer, le répertoire de sortie
 - Dans les kits de codes-barres, sélectionnez EXP-PBC096 et assurez-vous qu'il est réglé sur "Code-barres aux deux extrémités"