

Sep 11, 2024

Covid sekventering - SSI

Forked from a private protocol

DOI

[dx.doi.org/10.17504/protocols.io.j8nlkwqw6l5r/v1](https://doi.org/10.17504/protocols.io.j8nlkwqw6l5r/v1)



Theis Hass THTR Thorsen^{1,2}, Sekventeringsenheden SB^{1,2}

¹Department of Sequencing and Bioinformatics; ²Statens Serum Institut



Sekventeringsenheden SB

Sequencing and Bioinformatics

OPEN  ACCESS



DOI: [dx.doi.org/10.17504/protocols.io.j8nlkwqw6l5r/v1](https://doi.org/10.17504/protocols.io.j8nlkwqw6l5r/v1)

Protocol Citation: Theis Hass THTR Thorsen, Sekventeringsenheden SB 2024. Covid sekventering - SSI. [protocols.io
<https://doi.org/10.17504/protocols.io.j8nlkwqw6l5r/v1>](https://doi.org/10.17504/protocols.io.j8nlkwqw6l5r/v1)

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

Protocol status: Working

**We used this protocol before
automating the workflow.**

Created: April 19, 2023

Last Modified: September 11, 2024

Protocol Integer ID: 80773

Keywords: Covid, SARS-CoV-2, Virus, Statens Serum Institut, SSI, Sequencing, Illumina, Whole genome sequencing, WGS, Detection, NextSeq, NextSeq 550, High-throughput sequencing, High-throughput, Next-generation sequencing, NGS

Funders Acknowledgement:

**European Health and Digital
Executive Agency (HaDEA)**
Grant ID: 101111879

Disclaimer

This method was not developed from scratch at Statens Serum Institut. It is a method composed of methods from Beckman Coulter (RNA cleanup), NEB (RT-qPCR) and Illumina (Library preparation and sequencing). See under *Protocol References* for links to the original protocols.

Abstract

Method used at Statens Serum Institut for detection and sequencing of *SARS-CoV-2* from saliva tests.
This protocol is specified for high-throughput sequencing of 384 samples - 376 positive *SARS-CoV-2* samples + 8 control samples divided into four 96-well PCR plates. Furthermore, the samples are sequenced on the Illumina sequencing platform using a NextSeq 550.

Note, this protocol is in **Danish**.

Image Attribution

Statens Serum Institut, www.ssi.dk.

Guidelines

Arbejdsmængden i denne protokol kan med fordel deles over to dage.

Dag 1

RNA oprensning

RT-qPCR

Præ-PCR delen af biblioteksklargøringen

Dag 2

Post-PCR delen af biblioteksklargøringen

Sekventering

Materials

Instrumenter:

- Køl/Frys
- Centrifuge (prøverør fra patienter)
- Centrifuge (96-brønds plader)
- Centrifuge (1,5 mL rør / 15 mL rør / 50 mL rør)
- LAF bænk (1-3 stk.)
- Vortex
- Vortex ("multi-tube")
- Stinkskab
- RT-qPCR instrument (1-4 stk.)
- PCR instrument (1-4 stk.)
- Qubit 4 Fluorometer
- NextSeq 550

Redskaber:

- Pipetter - P10, P20, P200, P1000
- Multikanals - 0,2-10 uL, 10-300 uL, 50-1200 uL
- Magneter (96-brønds plader)
- Magneter (1,5 mL rør)
- Stopur
- Rent-rum (1-3 stk.)
- Køleblok (1,5 mL rør)

Forbrugsvarer:

- 96-brønds "Deep well"-plader
- 96-brønds PCR-plader
- 8-rør PCR-strimmel
- Qubit rør
- "Seals"
- Handsker (gerne med høj gennembrudstid)
- Sikkerhedsbriller
- Is

Protocol materials

-  Buffer Cartridge Illumina, Inc. Catalog #20024904 In 3 steps
-  Mid Output Reagent Cartridge v2.5 (150 cycles) Illumina, Inc. Catalog #20024904 In 5 steps
-  CPC HT Illumina, Inc. Catalog #20043401 Step 4
-  PK Buffer Beckman Coulter Catalog #C42150 Step 7.1
-  Luna WarmStart® RT Enzyme Mix (20X) NEB Catalog ##E3007E Step 25
-  RVT HT Illumina, Inc. Catalog # 20044407 Step 46
-  TB1 HT Illumina, Inc. Catalog #20044407 Step 61
-  Fluorescently-labeled probe Step 25
-  CPP2 HT Illumina, Inc. Catalog #20044407 Step 39
-  EtOH In 2 steps
-  TWB HT Illumina, Inc. Catalog # 20044406 In 2 steps
-  200mM Tris-HCl pH 7 Teknova Catalog #T2260 In 2 steps
-  EBLTS HT Illumina, Inc. Catalog # 20044406 In 2 steps
-  ITB Illumina, Inc. Catalog #20044405 In 4 steps
-  Proteinase K Beckman Coulter Catalog #C42176 In 2 steps
-  Luna Probe One-Step Reaction Mix (No ROX) (2X) NEB Catalog ##E3007E Step 25
-  CPP1 HT Illumina, Inc. Catalog #20044407 Step 39
-  RSB HT Illumina, Inc. Catalog # 20044406 In 4 steps
-  Nuclease-free Water In 3 steps
-  Wash WBE Beckman Coulter Catalog #C42172 In 2 steps
-  Target-specific Forward primer Step 25
-  Target-specific Reverse primer Step 25
-  FSM HT Illumina, Inc. Catalog #20044407 Step 39
-  Mid Output Flow Cell v2.5 Illumina, Inc. Catalog #20024904 In 2 steps
-  ST2 HT Illumina, Inc. Catalog #20044405 In 2 steps
-  100% Isopropanol In 2 steps
-  Lysis LBF Beckman Coulter Catalog #C42153 Step 10
-  Nuclease-free Water NEB Catalog ##E3007E Step 25
-  Qubit™ 1X dsDNA HS Assay Kit Invitrogen - Thermo Fisher Catalog #Q33231 Step 107
-  EPM HT Illumina, Inc. Catalog #20044407 In 2 steps

-  HT1 hybridization buffer **Illumina, Inc. Catalog #20015892** In 3 steps
-  IDT for Illumina- PCR Indexes Sets 1-4 **Illumina, Inc. Catalog #20043137** In 2 steps
-  RSB HT **Illumina, Inc. Catalog #20044409** Step 109
-  Bind BBD **Beckman Coulter Catalog #C42156** In 3 steps
-  IPM HT **Illumina, Inc. Catalog #20044407** In 2 steps
-  HT1 **Illumina, Inc. Catalog #20015892** Step 61
-  1 M NaOH In 2 steps
-  1 x PBS buffer Step 5
-  EPH3 HT **Illumina, Inc. Catalog #20044407** In 2 steps

Safety warnings

- ! Denne protokol involverer arbejde med levende *SARS-CoV-2* virus celler. Brug derfor gerne mundbind eller lignende beskyttelse.

Arbejd forsigtigt med korrekt beskyttelse (kittel, handsker og beskyttelsesbriller, stinksak) når der arbejdes med følgende reagenser:

Proteinase K



Sundhedsfare



Kronisk sundhedsfare

SDS:  RNAAdvance Viral.pdf 288KB

Wash WBE



Sundhedsfare



Ætsende

SDS:  RNAAdvance Viral.pdf 288KB

Lysis LBF:



Sundhedsfare



Kronisk sundhedsfare



Ætsende

SDS: [!\[\]\(2b376d1a92330ab09dad2665d2f89bf5_img.jpg\) RNAAdvance Viral.pdf](#) 288KB

ST2 HT



Sundhedsfare

SDS: [!\[\]\(c444627dab9fee9a1550c053ffaaaae2_img.jpg\) 20043141_SDS_ST2_HT_COVIDse...](#) 167KB

TB1 HT



Kronisk sundhedsfare



Sundhedsfare

SDS:  20043141_SDS_TB1_HT_COVIDse... 215KB

EPM HT



Kronisk sundhedsfare



Akut giftig



Miljøfare



Sundhedsfare

SDS:  20043141_SDS_EPM_HT_COVIDse... 172KB

Ethics statement

This protocol involves the use of human samples, and prior approval from the users' Institutional Review Board (IRB) or equivalent ethics committee(s) is required before usage. All procedures must comply with ethical guidelines and data protection regulations to ensure the privacy of personal information.

Before start

Husk at der til at start med arbejdes med levende vira. Brug derfor passende beskyttelse som kittel, handsker og mundbind.

Modtagelse af prøver

- 1 Modtag og registrér prøverne.
- 2 Opbevar prøverne på køl/frys (alt efter hvor lang tid der går, før prøverne skal bruges), eller fortsæt med det samme.

RNA-oprensning

3

Safety information

Der arbejdes med levende virus. Arbejd derfor forsigtigt med prøverne med korrekt personbeskyttelse (kittel, briller, handsker og mundbind).

Note

Arbejd med prøverne i et "rent-rum" for at undgå kontaminering af amplicons.

Centrifugér prøverørene for at samle prøvematerialet/-mediet (podepinde) i bunden af røret.

- 4 "Decap" prøverne i en LAF-bænk.
"Decap" derefter en negativ og positiv ( CPC HT Illumina, Inc. Catalog #20043401
[M] 5 Kopier pr. uL) kontrol.

Note

Hold kontrollerne adskilt fra prøverne for at undgå krydkontaminering af/fra kontrollerne.

- 5 Tilsæt  700 µL  1 x PBS buffer til alle prøverne og kontrollerne.
- 6 Ryst prøverne ved  750 rpm, Room temperature , 00:10:00 .

7 Imens klargøres følgende tre reagenser:

7.1 Klargøring af Proteinase K.

Safety information

Proteinase K



Sundhedsfare



Kronisk sundhedsfare

Arbejd med korrekt personbeskyttelse (kittel, briller og handsker).

Tilsæt  10 mL  PK Buffer Beckman Coulter Catalog #C42150 til røret/flasken med  Proteinase K Beckman Coulter Catalog #C42176 (Den endelige koncentration er 50 mg/mL).

For at undgå skum, mix ved at vende røret/flasken nogle gange og lad det stå i 5 minutters tid, inden det bruges. Opbevar Proteinase K opløsningen på -20 °C når det ikke bruges.

(Spring dette trin over hvis reagenset allerede er klar).

7.2 Klargøring af vaske buffer.

Safety information

Wash WBE



Sundhedsfare



Ætsende

Arbejd med korrekt personbeskyttelse (kittel, briller og handsker).

Tilsæt  225 mL  100% Isopropanol til flasken med

 Wash WBE Beckman Coulter Catalog #C42172 .

Notér på flasken hvornår der er blevet tilsat Isopropanol, og opbevar "Wash WBE" ved stuetemperatur.

(Spring dette trin over hvis reagenset allerede er klar).

7.3 Klargøring af "beads".

Note

"Beads" er nødt til at blive gjort klar på dagen, hvor de skal bruges.
Et eventuelt overskud kan ikke gemmes til dagen efter.

Vortex røret med  Bind BBD Beckman Coulter Catalog #C42156 i mindst 30 sek. for at få resuspendederet "beads" ordentligt.

Per prøve:

Mix  5 µL  Bind BBD Beckman Coulter Catalog #C42156 med  200 µL

 100% Isopropanol .

Mix grundigt.

- 8 Når prøverne er blevet vortexet, overfør da  200 µL fra hver prøve/kontrol til en "deep well" plade (94 prøver + 2 kontroller pr. plade).

Registrér i hvilken brønd hver prøve/kontrol bliver overført til.

- 9 Tilsæt  10 µL  Proteinase K Beckman Coulter Catalog #C42176 (50 mg/mL) til hver brønd med en prøve/kontrol.

10

Safety information

Lysis LBF



Sundhedsfare



Kronisk sundhedsfare



Ætsende

Arbejd med korrekt personbeskyttelse (kittel, briller og handsker).

Tilsæt  150 µL  Lysis LBF Beckman Coulter Catalog #C42153 til hver brønd.

Mix grundigt ved at pipettere op og ned 10 gange.

- 11 "Seal" pladen og lad den inkubere i  00:20:00 Room temperature .

20m

Note

Herefter er virus ikke længere aktivt (og kan dermed ikke smitte).

- 12 Tilsæt  205 µL  Bind BBD Beckman Coulter Catalog #C42156 (med isopropanol) til hver brønd, og mix 10 gange ved pipettering eller indtil de er mixet grundigt nok.
Husk at mix "beads" inden de overføres til prøverne.

5m

Inkubér prøverne i  00:05:00 Room temperature .

- 13 Placér prøvepladen på en magnet og vent i  00:05:00 .

5m

- 14 *Imens prøvepladen er på magneten.*
Fjern supernatanten og smid det ud.

- 15 Fjern prøvepladen fra magneten.

Tilsæt  400 µL  Wash WBE Beckman Coulter Catalog #C42172 (med isopropanol) til hver brønd for at vaske "beads".
Mix 10 gange ved pipettering for at resuspendere de magnetiske "beads".

- 16 Placér prøvepladen på en magnet og vent i  00:05:00 .
Prøverne (væsken) skal være 'klar', før der fortsættes.

5m

- 17 *Imens prøvepladen er på magneten. Undgå at forstyrre pellet med magnetiske "beads".*
Fjern supernatanten og smid det ud.

- 18 *Imens prøvepladen er på magneten. Prøverne skal ikke mixes.*

Vask prøverne ved at tilsætte  400 µL [M] 70 % (v/v)  EtOH , og lad prøverne stå i ~  00:02:00 .

2m

Fjern ethanolen.

- 19 Gentag trin 18.

- 20 Lad de magnetiske "beads" tørre i  00:01:00 Room temperature for at få de sidste dråber af ethanol til at fordampe. Undgå dog at "beads" tørrer helt ud. 1m
- 21 Fjern prøvepladen fra magneten.
Eluér RNA ved at tilføje  40 µL  Nuclease-free Water til hver brønd.
Mix 10 gange ved pipettering og inkubér prøverne i  00:05:00 Room temperature (RNA'et er nu i væsken). 5m
- 22 Stil prøvepladen tilbage på en magnet og vent i  00:02:00. 2m
- 23 Overfør eluatet med RNA fra hver brønd til de tilsvarende brønde i en ny 96-brønds PCR plade (uden at medtage "beads").
Stil straks prøverne med RNA på is (hvis de skal bruges med det samme) eller gem dem i længere tid på -20 til -80 °C.
- 24 Hvis denne RNA-oprensning kun har været af positive prøver, spring da til 'Covid sekventering - pre-PCR'.
Ellers fortsæt med 'RT-qPCR' nedenfor.

RT-qPCR

- 25 Start med at klargøre RT-qPCR "Master Mix" (MM) i et "rent-rum" **væk fra prøverne for at undgå kontaminering.**

Følgende komponenter skal bruges:

-  Luna Probe One-Step Reaction Mix (No ROX) (2X) **NEB Catalog ##E3007E**
-  Luna WarmStart® RT Enzyme Mix (20X) **NEB Catalog ##E3007E**
-  Nuclease-free Water **NEB Catalog ##E3007E**
-  Target-specific Forward primer
-  Target-specific Reverse primer
-  Fluorescently-labeled probe

Note

Primer og probe benyttet af Testcenter DK. Bestilt hos LGC Biosearch.

"Forward primer" - E_Sarbeco_F
ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT

"Reverse primer" - E_Sarbeco_R
ATATTGCAGCAGTACGCACACA

Fluorescerende probe - E_Sarbeco_P1
FAM-ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG-BHQ1

Tø alle komponenterne ved stuetemperatur og stil dem på is.

Når alle komponenterne er tøet op, mix kortvarigt hver komponent ved at vende røret, pipettering eller forsiktig vortexing.

Benyt nedenstående tabel og gang voluminerne med antallet af prøver der skal analyseres (+1-2 prøver for at have nok MM).

Komponenter	uL pr. prøve
Luna Probe One-Step React Mix (NoRox) (2X)	12,5
Dnase/ Rnase frit vand	3,75
Luna WarmStart RT Enzyme Mix (20X)	1,25
Forward primer (10 uM)	1
Reverse primer (10 uM)	1
Probe (10 uM)	0,5
Total	20

Komponenter og voluminer (pr. prøve) til RT-qPCR MM.

Mix MM grundigt men forsigtigt ved pipettering eller vortexing efterfulgt af en kort centrifugering.

- 26 Pipettér 20 µL MM til hver brønd (svarende til antal prøver + kontroller) i en ny 96-brønds PCR plade. **Undgå bobler.**
- 27 Overfør 5 µL RNA prøve materiale fra alle brønde i eluat-pladen til den nye plade med MM. **Gør det forsigtigt for at undgå kontaminering mellem prøverne.**
- 28 Luk pladen med optisk transparent "seal". **Det er vigtigt at prøverne er helt lukket til for at undgå fordampning under RT-qPCR.**

- 29 Spin pladen ved  2500-3000 rpm, Room temperature, 00:01:00 for at fjerne bobler og samle dråber.
- 1m
- 30 Programmér "real-time" PCR instrumentet.

Note

RT-qPCR programmet der blev brugt hos Testcenter DK til bestemmelse af Covid-19.

Trin	Temp.	Tid	Runder
"Reverse Transcription"	55°C	10:00	1
"Initial Denaturation"	95°C	03:00	1
"Denaturation"	95°C	00:15	
"Extension"	58°C	00:30	45

RT-qPCR program

Husk:

- At "plate read" skal være inkluderet i slutningen af hver "extension" trin.
- At passende detektionskanal(er) for den eller de valgte fluoroforer er til stede.

Noter:

Hos Testcenter DK blev følgende to "real-time" PCR instrumenter benyttet:

Biorad CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System

Biorad CFX OPUS Real-Time PCR system

- 31 Sæt prøvepladen i "real-time" PCR instrumentet og igangsæt kørslen.

Analyse af RT-qPCR resultater

- 32 Åben datafilen i det valgte data analyse program.

Note

Hos Testcenter DK blev softwaren 'CFX Maestro' fra Biorad benyttet.

- 33 Sæt 'baseline'.
(i CFX Maestro) Vælg "Apply Fluorescence Drift Correction" fra menuen "Settings" → "Baseline Settings".

- 34 Sortér Ct-værdier (høj til lav).
Dobbelt-klik på trekanten i kolonnen (Cq) med Ct-værdier.
- 35 Hvis der er signal-støj i de første 10 cykler, som forstyrre analysen af PCR-kurverne, skær da de første 10 cykler væk.
Tryk på "Settings"→"Cycle to analyze" og ændre fra 1 til 10.
- 36 Vurdér om den positive kontrol har en sigmoid (S-formet) PCR-kurve.
Hvis der ikke er tale om en S-kurve, skal prøverne køres om.
- 37 Vurdér om prøverne er positive, inkonklusive eller negative baseret på de tre parametre:
 - "End relative fluorescence units" (End RFU)
 - Ct-værdi
 - Er PCR-kurven sigmoid eller ej (subjektiv bedømmelse)

Positiv prøve

Scenarie	Parameter	Værdi
1	End RFU	> 500
	Ct-værdi	10 - 38
	PCR-kurve	sigmoid

Inkonklusiv prøve

Scenarie	Parameter	Værdi
1	End RFU	> 500
	Ct-værdi	38 - 40
2	End RFU	> 500
	Ct-værdi	10 - 38
	PCR-kurve	ikke sigmoid

Negativ prøve

Scenarie	Parameter	Værdi
1	End RFU	< 500
2	Ct-værdi	< 10
3	Ct-værdi	> 40

- 38  go to step #7 (RNA-oprensning) og lav en frisk RNA-oprensning af de positive prøver.

Covid sekventering - pre-PCR

39

Note

Følgende arbejde skal udføres i et "rent-rum" og/eller (ren) LAF-bænk for at undgå kontaminering af amplicons og det forgående arbejde.

De følgende to MM kan med fordel klargøres i samme rum som den tidlige MM (til RT-qPCR) for at være sikker på at undgå kontaminering.

Start med at finde følgende reagenser frem fra -20°C-fryseren:

 EPH3 HT Illumina, Inc. Catalog #20044407

 FSM HT Illumina, Inc. Catalog #20044407

 CPP1 HT Illumina, Inc. Catalog #20044407

 CPP2 HT Illumina, Inc. Catalog #20044407

 IPM HT Illumina, Inc. Catalog #20044407

Lad dem tø ved stuetemperatur, og hold dem derefter på is indtil de skal bruges.

"Anneal RNA"

- 40 Navngiv en 96-brønds PCR plade med 'CDNA' + et unikt ID.
- 41 Vend røret med  EPH3 HT Illumina, Inc. Catalog #20044407 nogle gange og til sæt  9 µL til det nødvendige antal brønde i CDNA-pladen.
- 42 Overfør herefter  9 µL fra hver brønd i eluat-pladen (positive prøver + kontroller) til CDNA-pladen.
- 43 "Seal" og ryst prøverne ved  1600 rpm, Room temperature , 00:01:00 .
- 44 Centrifugér prøverne ved  1000 rpm, Room temperature , Kortvarigt .

- 45 Kør PCR på prøverne med "Anneal"-programmet.

Note

"Anneal"-program

Temp.	Tid	Runder
65°C	03:00	1
4°C	∞	1

"Anneal"-program

Husk:

- "Preheat lid" skal vælges til.
- Reaktions volumen er 18 µL.

Syntetisering af "first strand cDNA"

- 46 Hent  RVT HT Illumina, Inc. Catalog # 20044407 fra -20°C-fryseren og stil det direkte på is (skal hele tiden holdes kold).
- 47 Klargør "first strand cDNA" MM.
 Benyt nedenstående tabel og gang voluminerne med antallet af prøver (+1-2 prøver for at have nok MM. Hvis der er mange prøver så tilsæt lidt ekstra).
 Vend begge komponenter nogle gange før de bruges.

Komponenter	µL pr. prøve
FSM HT	9
RVT HT	1
Total	10

Komponenter og voluminer (pr. prøve) til "first strand cDNA" MM.

- Vend forsigtigt den endelige MM nogle gange.
- 48 Tilsæt  8.5 µL MM til hver brønd med prøver og kontroller.
Gør det forsigtigt og husk at skifte spids mellem hver brønd for at undgå kontaminering mellem prøverne.
- 49 "Seal" og ryst prøverne ved  1600 rpm, Room temperature , 00:01:00 .

50 Centrifugér prøverne ved  1000 rpm, Room temperature , Kortvarigt .

51 Kør PCR på prøverne med "FSS"-programmet.

Note

"FSS"-program

Temp.	Tid	Runder
25°C	05:00	1
50°C	10:00	1
80°C	05:00	1
4°C	∞	1

"FSS"-program

Husk:

- "Preheat lid" skal vælges til.
- Reaktions volumen er 26,5 µL.

Amplificering af cDNA

52 For hver CDNA-plade, navngiv to nye med hhv. "COVA" og "COVB" + et unik ID så det er tydeligt, at de hører sammen.

COVA- og COVB-pladerne er to separate PCR reaktioner til hver prøve + kontrol i den tilhørende CDNA-plade.

53 Klargør "COVIDseq PCR A" MM og "COVIDseq PCR B" MM.

Benyt nedenstående tabel og gang voluminerne med antallet af prøver (+1-2 prøver for at have nok MM. Hvis der er mange prøver så tilsæt nogle ekstra).

Vend  nogle gange før det bruges.

Komponenter	COVIDseq PCR A - uL pr. prøve	COVIDseq PCR B - uL pr. prøve
IPM HT	15	15
CPP1 HT	4,3	-
CPP2 HT	-	4,3
Nuclease-frit vand	4,7	4,7
Total	24	24

Komponenter og voluminer (pr. prøve) til "COVIDseq PCR" MM A og B.

Vend forsigtigt de endelige MM nogle gange for at blande dem.

54 Tilsæt  20 µL "COVIDSeq PCR **A**" MM til hver nødvendig brønd i COVA-pladen.

55 Tilsæt  20 µL "COVIDSeq PCR **B**" MM til hver nødvendig brønd i COVB-pladen.

56 Overfør  5 µL fra hver brønd i CDNA-pladen til de tilsvarende COVA- og COVB-plader.

Gør det forsigtigt og husk at skifte spids mellem hver brønd for at undgå kontaminering mellem prøverne.

57 "Seal" og ryst prøverne ved  1600 rpm, Room temperature , 00:01:00 .

58 Centrifugér prøverne ved  1000 rpm, Room temperature , Kortvarigt .

59 Kør PCR på prøverne med "COVIDSeq PCR"-programmet.

Note

"COVIDSeq PCR"-program

Temp.	Tid	Runder
98°C	03:00	1
95°C	00:15	35
63°C	05:00	
4°C	∞	1

"COVIDSeq PCR"-program

Husk:

- "Preheat lid" skal vælges til.
- Reaktions volumen er 25 µL.

Prøverne kan blive i PCR-instrumentet natten over.

Covid sekventering - post-PCR

60

Note

For at undgå krydskontamineringer med amplicons skal det efterfølgende arbejde foregå i et andet rum dedikeret til at arbejde med amplicons.

- 61 Find følgende reagenser frem.

Reagenser opbevaret ved stutemperatur:

 ST2 HT Illumina, Inc. Catalog #20044405

 ITB Illumina, Inc. Catalog #20044405

Reagenser opbevaret på køl:

 EBLTS HT Illumina, Inc. Catalog # 20044406

 Nuclease-free Water

 TWB HT Illumina, Inc. Catalog # 20044406

 RSB HT Illumina, Inc. Catalog # 20044406 - Hold røret på is indtil en halv time før det skal bruges.

Reagenser opbevaret på frost:

 TB1 HT Illumina, Inc. Catalog #20044407 - Hold røret på is.

 EPM HT Illumina, Inc. Catalog #20044407 - Sæt på is når det er tøet op.

 HT1 Illumina, Inc. Catalog #20015892 - Sæt på is når det er tøet op.

 IDT for Illumina- PCR Indexes Sets 1-4 Illumina, Inc. Catalog #20043137

Safety information

ST2 HT



Sundhedsfare

Arbejd med korrekt personbeskyttelse (kittel, briller og handsker).

Safety information

TB1 HT



Kronisk sundhedsfare



Sundhedsfare

Arbejd med korrekt personbeskyttelse (kittel, briller og "tykke" handsker).

Safety information

EPM HT



Kronisk sundhedsfare



Akut giftig



Miljøfare



Sundhedsfare

Arbejd med korrekt personbeskyttelse (kittel, briller og "tykke" handsker).

Tagmentering af PCR Amplicons

11m

62 Start med at navngive en ny 96-brønuds PCR plade med "TAG1" + et unik ID.

63 Kombinér COVA- og COVB-pladen på følgende måde:

- 63.1 Overfør  10 µL fra hver brønd i COVA-pladen til den tilhørende brønd i TAG1-pladen.
- 63.2 Overfør  10 µL fra hver brønd i COVB-pladen til den tilhørende brønd i TAG1-pladen, der indeholder materiale fra COVA-pladen.
- 64 Klargør "Tagmentation" MM.
Benyt nedenstående tabel og gang voluminerne med antallet af prøver (+1-2 prøver for at have nok MM).
Vortex  EBLTS HT Illumina, Inc. Catalog # 20044406 grundigt før brug.

Safety information

Følgende arbejde skal foregå i et stinksak, da **TB1 HT** indeholder **N,N-Dimethylformamid**.
Arbejd med korrekt personbeskyttelse (kittel, briller og "tykke" handsker).

Komponenter	uL pr. prøve
TB1 HT	12
EBLTS HT	4
Nuclease-frit vand	20
Total	36

Komponenter og voluminer (pr. prøve) til "Tagmentation" MM.

Vend forsigtigt den endelige MM nogle gange.

- 65 Tilsæt  30 µL MM til alle brønde med prøver og kontroller i TAG1-pladen.
Gør det forsigtigt og husk at skifte spids mellem hver brønd for at undgå kontaminering mellem prøverne.
- 66 "Seal" og ryst prøverne ved  1600 rpm, 00:01:00 minut. 3m
- 67 Kør PCR på prøverne med "COVIDSeq TAG"-programmet (Tager ca. 7 min). 8m

Note

"COVIDSeq TAG"-program

Temp.	Tid	Runder
55°C	05:00	1
10°C	∞	1

"COVIDSeq TAG"-program

Husk:

- "Preheat lid" skal vælges til.
- Reaktions volumen er 50 µL.

Post Tagmenterings "Clean Up"

1m

68 Centrifugér TAG1-pladen ved  1000 rpm, Room temperature , Kortvarigt .

69

Safety information

Følgende arbejde skal foregå i et stinksak, da **TB1 HT** (der er i brøndende på TAG1-pladen) indeholder **N,N-Dimethylformamid**.

Arbejd med korrekt personbeskyttelse (kittel, briller og "tykke" handsker).

Tilsæt  10 µL  ST2 HT Illumina, Inc. Catalog #20044405 til alle brønde med prøver og kontroller i TAG1-pladen.

Gør det forsigtigt og husk at skifte spids mellem hver brønd for at undgå kontaminering mellem prøverne samt skum og bobler i prøverne.

70 "Seal" og ryst prøverne ved  1600 rpm, 00:01:00 minut .

71 Inkubér prøverne i  00:05:00 Room temperature 5m

72 Centrifugér TAG1-pladen ved  1000 rpm, Room temperature , Kortvarigt . Inspicér for bobler på sealet. Hvis der er nogen, så gentag centrifugeringen.

- 73 Fjern "seal" og sæt TAG1-pladen på en magnet.
Vent til væsken er klar (~ 00:03:00). 3m
- 74 Fjern og kassér supernatanten.
Gør det forsigtigt og husk at skifte spids mellem hver brønd for at undgå kontaminering mellem prøverne.
Undgå at forstyrre pellet.
- 75 Vask "beads" **2 gange** på følgende måde:
- 75.1 Tag TAG1-pladen af magneten.
- 75.2 Tilsæt **100 µL** **TWB HT Illumina, Inc. Catalog # 20044406** til alle brønde med prøver og kontroller.
Undgå at komme i kontakt med væsken i brøndene, og skift spidser efter hver plade.
- 75.3 "Seal" og ryst prøverne ved **1600 rpm, 00:01:00 minut**.
- 75.4 Centrifugér TAG1-pladen ved **1000 rpm, Room temperature , Kortvarigt**.
- 75.5 Fjern "seal" og sæt TAG1-pladen på en magnet.
Vent til væsken er klar (~ 00:03:00). 3m
- 75.6 **Første vask:**
Fjern og kassér supernatanten.
Gør det forsigtigt og husk at skifte spids mellem hver brønd for at undgå kontaminering mellem prøverne. Undgå at forstyrre pellet.
- Anden vask:**
Gå videre til næste trin.
- ## Amplificering af Tagmenterede Amplicons
- 76 Start med at tø en plade med **IDT for Illumina- PCR Indexes Sets 1-4 Illumina, Inc. Catalog #20043137** op. 1m

Vortex derefter pladen med index' ved  1600 rpm, 00:01:00 og spin den ned ved

 1000 rpm, Room temperature, 00:01:00 .

77 Klargør PCR MM.

Benyt nedenstående tabel og gang voluminerne med antallet af prøver (+1-2 prøver for at have nok MM).

Vend  EPM HT Illumina, Inc. Catalog #20044407 nogle gange før brug.

Safety information

Følgende arbejde skal foregå i et stinksak, da **EPM HT** indeholder **Tetramethylammonium chloride**.

Arbejd med korrekt personbeskyttelse (kittel, briller og "tykke" handsker).

Komponenter	uL pr. prøve
EPM HT	24
Nuclease-frit vand	24
Total	48

Komponenter og voluminer (pr. prøve) til PCR MM.

Vend den endelige MM nogle gange.

78 *Imens TAG1-pladen står på magneten. Gør det forsigtigt og husk at skifte spids mellem hver brønd for at undgå kontaminering mellem prøverne. Undgå at forstyrre pellet.*

Fjern og kassér supernatanten.

Brug derefter en 20 uL pipette til at fjerne de sidste rester af vaske buffer.

79 Tag TAG1-pladen af magneten.

80 Tilsæt  40 µL MM til alle brønde med prøver og kontroller i TAG1-pladen.

Gør det forsigtigt for at undgå kontaminering mellem prøverne.

81 Åbn index-adaptor pladen ved at trykke en ny PCR-plade igennem folieselet - kassér derefter PCR-pladen. **Brug en ny PCR-plade til hver ny index-adapter plade.**

82 Overfør  10 µL fra hver brønd i index-adaptor pladen til den tilhørende brønd i TAG1-pladen.

Gør det forsigtigt og husk at skifte spids mellem hver brønd for at undgå kontaminering mellem prøverne.

- 83 "Seal" og ryst prøverne ved  1600 rpm, 00:01:00 minut .
- 84 Hvis der er væske på sealet centrifugeres TAG1-pladen ved  1000 rpm , Kortvarigt .
For at resuspendere "beads", ryst pladen ved  1600 rpm Kortvarigt .
- 85 Kør PCR på prøverne med "COVIDSeq TAG PCR"-programmet.

Note

"COVIDSeq TAG PCR"-program

Temp.	Tid	Runder
72°C	03:00	1
98°C	03:00	1
98°C	00:20	
60°C	00:30	7
72°C	01:00	
72°C	03:00	1
10°C	∞	1

"COVIDSeq TAG PCR"-program

Husk:

- "Preheat lid" på  100 °C skal vælges til.
- Reaktions volumen er 50 µL.

"Pool" og oprensning af biblioteker

14m 40s

- 86 Stil  RSB HT Illumina, Inc. Catalog # 20044406 ved stuetemperatur så det kan temperere (~  00:30:00).
- 87 Centrifugér TAG1-pladen ved  1000 rpm, Room temperature, 00:00:10 .
- 88

30m

10s

3m

Safety information

Husk at der stadig arbejdes med **EPM**.

Arbejd i et stinksak og med korrekt personbeskyttelse (kittel, briller og "tykke" handsker).

Fjern "seal" og sæt TAG1-pladen på en magnet.

Vent til væsken er klar (~  00:03:00).

89 Samle ("Pool") prøverne og kontrollerne fra TAG1-pladen i et 1,5 mL rør på følgende måde:

89.1 Brug en 10 µl otte-kanals pipette til at overføre  5.5 µL prøvemateriale fra hver brønd i TAG1-pladen til en 8 rør PCR-strimmel. **Skift spidser efter hver kolonne.**
Re-suspendér ved forsigtigt at pipettere op og ned nogle gange.

Dette resulterer i  66 µL "poolet" bibliotek pr. række fra TAG1-pladen (hvis pladen er fyldt).

89.2 Navngiv et nyt 1,5 mL rør "Pooled ITB" + et unikt ID.

89.3 Overfør  55 µL "poolet" bibliotek fra hver brønd i 8 rør PCR-stimlen til "Pooled ITB"-røret.

For **hver** prøveplade bliver resultatet et "Pooled ITB"-rør med  440 µL "pooled" bibliotek (hvis prøvepladen er fyldt).

90 Vortex "Pooled ITB"-røret for at blande og centrifugér kortvarigt.

91 Vortex  ITB Illumina, Inc. Catalog #20044405 for at re-suspendere.

92 Tilsæt  ITB Illumina, Inc. Catalog #20044405 svarende til den resulterende volumen i "Pooled ITB"-røret ganget med 0,9.

For eksempel, for 96 prøver, tilsæt  396 µL  ITB Illumina, Inc. Catalog #20044405 til "Pooled ITB"-røret.

93 Vortex for at blande.

- 94 Inkubér ved stuetemperatur i  00:05:00 5m
 - 95 Centrifugér kort.
 - 96 Sæt "Pooled ITB"-røret på en magnet og vent til væsken er klar (~  00:05:00). 5m
 - 97 Fjern og kassér supernatanten.
 - 98 Vask "beads" **2 gange** på følgende måde:
 - 98.1 Lad "Pooled ITB"-røret blive på magneten og tilset  1000 µL frisk  80 % (v/v)  EtOH til røret.
 - 98.2 Vent  00:00:30 . 30s
 - 98.3 Fjern og kassér supernatanten.
 - 99 Brug en 10 µL pipette til at fjerne rester af EtOH.
- Note**

Herefter behøver man ikke længere arbejde i et stinksak.
- 100 Tilsæt  55 µL  RSB HT Illumina, Inc. Catalog # 20044406
 - 101 Vortex "Pooled ITB"-røret for at blande og centrifugér kort.

- 102 Inkubér ved stuetemperatur i  00:02:00 . 2m
- 103 Sæt "Pooled ITB"-røret på magneten og vent til væsken er klar (~  00:02:00). 2m
- 104 Overfør  50 µL supernatant fra "Pooled ITB"-røret til et nyt rør mærket "PP" (står for "Plate Pool") + et unikt ID.

Kvantificering og Normalisering

- 105 Fortynd biblioteket fra PP-røret 1:10 i et nyt rør ved at blande  4 µL bibliotek i  36 µL  RSB HT Illumina, Inc. Catalog # 20044406 .
- 106 Vortex og spin ned.
- 107 Bestem koncentrationen af 1:10-fortyndingen på en

Equipment

Qubit 4

Fluorometer

NAME

Invitrogen

TYPE

Q33238

BRAND

<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/Q33238> 



med et

 Qubit™ 1X dsDNA HS Assay Kit Invitrogen - Thermo Fisher Catalog #Q33231 (mål på 10µL).

Hvis biblioteket er uden for standardområdet, så mål i stedet på det ufortyndede bibliotek (PP-røret).

Note

Hvordan man mäter på Qubit (10 µL prøve)

- Tag et antal Qubit-rør (Invitrogen - Thermo Fisher #Q32856) frem matchende antallet af biblioteker + 2 mere til standarder.
- Pipettér  190 µL "working solution" i hvert rør.
- Tilføj  10 µL prøve eller standard.
- Vortex alle rør og inkubér dem i  00:02:00 ved stuetemperatur. Tjek at der ikke er nogle bobler i væsken.
- Fra forsiden på instrumentet vælg *dsDNA* og derefter *1x dsDNA High Sensitivity*.
- Vælg *Read Standards* og følg anvisningerne.
- Efter begge standarder er målt, vælg *Run samples* og sørge for at "original sample volume" er sat til **10µL**, samt at "output sample units" er sat til **ng/µL**.
- Sæt den første prøve i instrumentet og vælg *Read tube*. Notér koncentrationen.
- Forsæt med de resterende prøver.

108 Beregn molariteten (i nM) ved hjælp af følgende formel:

- Brug 400 bp som den gennemsnitlige biblioteksstørrelse.

$$\frac{\text{Konc. på bibliotek ng/}\mu\text{L}}{660 \frac{\text{g}}{\text{mol}} * \text{Gns. biblioteksstørrelse (bp)}} * 10^6 = \text{Molariteten (nM)}$$

Beregning af biblioteks molariteten ud fra en koncentration (ng/uL)

109 Fortynd biblioteket i et nyt rør med en minimum volumen på  30 µL og en koncentration på

 4 nanomolar (nM). Fortynd med  RSB HT Illumina, Inc. Catalog #20044409.

Vortex og spin ned.

110 Overfør  25 µL fra 1-4 rør med 4 nM-fortyndinger til et nyt rør mærket "FP" (Står for "Final

Pool") + et unikt ID.

Note

Det er muligt at samle flere biblioteker i den endelige FP. Hvor mange er styret af valget af sekventeringsinstrument samt valget af sekventeringskit. I denne protokol sekventeres der på en NextSeq 550 med et "Mid Output 150 cycle" kit, hvilket giver mulig for at kunne sekventere 376 SARS-CoV-2 prøver + 8 kontroller - det svarer til 4 prøveplader/biblioteker.

111 Vortex FP-røret.

Sæt FP-røret på is indtil det skal bruges.

Hvis det ikke skal bruges med det samme, så opbevar det på -20°C frys.

Sekventering

112 Find følgende reagenser frem

Opbevares ved stuetemperatur:

 Buffer Cartridge Illumina, Inc. Catalog #20024904

 200mM Tris-HCl pH 7 Teknova Catalog #T2260

Opbevares på køl:

 Mid Output Flow Cell v2.5 Illumina, Inc. Catalog #20024904

 1 M NaOH

Opbevares på frost:

 Mid Output Reagent Cartridge v2.5 (150 cycles) Illumina, Inc. Catalog #20024904

- Kan sættes på køl dagen før for at tø.

 HT1 hybridization buffer Illumina, Inc. Catalog #20015892

- Stil på is når det er tøet op.

Denaturering og fortyndning af biblioteker

5m

113 Lav en frisk [M] 0.2 Molarity (M) fortyndning af NaOH.

I et eppendorfrør blandes  400 µL  Nuclease-free Water med  100 µL

 1 M NaOH .

Vortex kort.

114 Overfør 5 µL bibliotek fra FP-røret til et nyt 1,5 mL-rør.

- 115 Tilsæt  5 μ L 0.2 M NaOH.
- 116 Vortex og centrifugér kortvarigt.
- 117 Inkubér ved stuetemperatur i  00:05:00 . 5m
- 118 Tilsæt  5 μ L  200mM Tris-HCl pH 7 **Teknova Catalog #T2260** til røret.
- 119 Vortex og centrifugér kortvarigt.
- 120 Tilsæt  985 μ L afkølet  HT1 hybridization buffer **Illumina, Inc. Catalog #20015892** til røret (koncentrationen er nu $[M]$ 20 picomolar (pM)).
- 121 Vortex og centrifugér kortvarigt.
- 122 Sæt røret på is.
- 123 Fortynd til $[M]$ 1.3 picomolar (pM) i et nyt 1,5 mL rør ved at blande  85 μ L $[M]$ 20 picomolar (pM) denatureret bibliotek med  1215 μ L afkølet  HT1 hybridization buffer **Illumina, Inc. Catalog #20015892**.
- 124 Vend røret et par gange og centrifugér kortvarigt.
- 125 Hold røret på is indtil sekventeringen skal klargøres.

NextSeq 550 kørsel

- 126 Vend  Mid Output Reagent Cartridge v2.5 (150 cycles) **Illumina, Inc. Catalog #20024904** og

 Buffer Cartridge Illumina, Inc. Catalog #20024904 fem gange for at blande

reagenserne.

127 Overfør hele  1.3 picomolar (pM) biblioteket til

 Mid Output Reagent Cartridge v2.5 (150 cycles) Illumina, Inc. Catalog #20024904 i

den markerede position på kassetten.

128 Tryk på *Experiment* på skærmen af

Equipment

NextSeq 550

NAME

DNA Sequencer

TYPE

Illumina

BRAND

SY-415-1002

SKU

<https://emea.illumina.com/systems/sequencing-platforms/nextseq/order-nextseq-550.html>

LINK



129 Tryk på *Sequence*.

130 Vælg én af to "setup" muligheder:

130.1 **Manual**

Note

På forhånd udfyldes et "sample sheet" med alle de ønskede indstillinger og prøveinformationer.

Eksempel på "sample sheet":  Eksempel på Nextseq550 sample sh... 12KB

Noter:

- Grønne markeringer omkranset af '<...>' skal udfyldes/ændres med de ønskede informationer.
- Det endelige "Sample Sheet" skal gemmes som .csv-fil. Ellers accepterer instrumentet ikke filen.

Indtast et "Run Name" (og et "Library ID" hvis det ønskes).

Vælg **paired end**.

Indtast følgende informationer:

Index 1 og *Index 2* sættes til **10**,

Read 1 og *Read 2* sættes til **74**.

Vælg den ønskede "output folder".

"Browse" og vælg det klargjorte "sample sheet".

Vælg "Purge consumables for this run" til.

Tryk på *Next*.

130.2 Local Run Manager

Note

På forhånd klargøres kørslen ("Create run") i Local Run Manager (LRM) med de ønskede indstillinger og prøveinformationer.

I denne protokol vælges der **paired end**,
og

Index 1 og *Index 2* sættes til **10**,
Read 1 og *Read 2* sættes til **74**.

LRM åbnes enten fra skrivebordet på instrumentet, ved at åbne chromium eller ved at åbne og logge ind på LRM fra en arbejdscomputer, hvis computer og instrument er på samme netværk.

Se *Local Run Manager Off-Instrument Software Guide (1000000011909)* for hjælp til den sidste mulighed.

https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/software_documentation/local-run-manager/local-run-manager-off-instrument-software-guide-1000000011909-00.pdf

Vælg det ønskede "run" fra listen med klargjorte kørsler.

Vælg den ønskede "output folder".

Tryk på *Next*.

- 131 Pak  Mid Output Flow Cell v2.5 Illumina, Inc. Catalog #20024904 ud af indpakningen, og hold på siderne af flow cellen **uden at røre ved glasset**.
- 132 Placér flow cellen i instrumentet som ansvist på skærmen.
Tryk på *Load*.
- 133 Når lågen er lukket til, og sensorerne har registreret flow cellen, tryk på *Next*.
- 134 Åben lågen til højre på fronten af instrumentet.
- 135 Fjern affaldsbeholderen (den nederste beholder) med brugte reagenser, fragt affaldsbeholderen sikkert til et stinksak (f.eks. i en lukket, tyk plastik pose) og kassér indholdet i overensstemmelse med gældende regionale, nationale og lokale love og regler.



Safety information

Affaldet indeholder **N,N-Dimethylformamid**.

**Kronisk sundhedsfare****Sundhedsfare**

Arbejd med korrekt personbeskyttelse (kittel, briller og "tykke" handsker).

- 136 Skub affaldsbeholderen tilbage ind på sin plads i instrumentet.
Når der høres/føles et klik, er den på plads.
- 137 Skub  Buffer Cartridge Illumina, Inc. Catalog #20024904 ind på pladsen oven over affaldsbeholderen, som vist på skærmen.
Når der høres/føles et klik, er den på plads.
- 138 Når sensorerne har registreret beholderen, luk lågen og tryk på *Next*.
- 139 Åben lågen til venstre på fronten af instrumentet.
- 140 Skub  Mid Output Reagent Cartridge v2.5 (150 cycles) Illumina, Inc. Catalog #20024904 ind i reagensrummet indtil kassetten ikke kan komme længere ind.
- 141 Luk lågen til reagensrummet og tryk på *Load*.

142 Når kassetten er kørt i position og sensorerne har registreret den, tryk på *Next*.

143 Tjek at "run parameters" er korrekte og tryk på *Next*.

144 Når instrumentet er færdig med at lave et automatisk tjek, tryk på *Start*.

Herefter begynder NextSeq'en at sekventere.

Hvor lang tid tager kørslen?

145 En kørsel med en

 Mid Output Reagent Cartridge v2.5 (150 cycles) Illumina, Inc. Catalog #20024904

tager ~16 timer.

Protocol references

RNA-oprensningen er baseret på protokollen "RNAdvance Viral" af Beckman Coulter:

[https://www.beckman.com/search#q=c63510&t=coveo-tab-techdocs&f:@category=\[Consumable%20IFU%2FSetting%20Sheet\]&f:@documentlanguage=\[English\]](https://www.beckman.com/search#q=c63510&t=coveo-tab-techdocs&f:@category=[Consumable%20IFU%2FSetting%20Sheet]&f:@documentlanguage=[English])

RT-qPCR er baseret på protokollen "Luna® Probe One-Step RT-qPCR Kit (No ROX)" af New England Biolabs:

<https://international.neb.com/-/media/nebus/files/manuals/manuale3007.pdf?rev=55ca1f890ce349b1a4f90a91f5dd2619&hash=9266AFA71FBCA0CAE10A6E213D40CDB1>

Klargøring af bibliotek og opsætning af sekventering er baseret på følgende tre protokoller fra Illumina:

Illumina COVIDSeq Test - Reference Guide - #1000000126053 v2

https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/Illumina-COVIDSeq-Test/illumina-covidseq-test-reference-guide-ruo-1000000126053-04.pdf

Denature and Dilute Libraries for the NextSeq 500 and NextSeq 550 Sequencing Systems - #15048776 v16

https://support-docs.illumina.com/IN/NextSeq550_DnD/Content/NextSeq550/DnD-NS550.htm?protocol=standard

NextSeq 500 and NextSeq 550 Sequencing Systems - #15069765 v06

https://support-docs.illumina.com/IN/NextSeq_550-500/Content/IN/FrontPages/NextSeq-550-500.htm