



PROTOCOL DE SECVENȚIERE SARS-COV-2¹

Înainte de a începe!

Pregătiți între 11 - 95 de probe de ARN plus 1 control negativ.

SINTEZA CDNA

30MIN

1. Se prepară între 11 și 95 de probe de ARN plus 1 control negativ (H₂O fără nucleaze) per bibliotecă. Dacă a fost congelat anterior, amestecați prin vortexare scurtă, urmata de un puls de centrifugare pentru a colecta lichidul. Păstrați probele pe gheață tot timpul!

Nota: Cel puțin 11 eșantioane sunt necesare pentru a avea suficient material de încărcat pe secvențiator la sfârșit. Dacă procesați >23, veți avea nevoie de kitul de extensie EXP-NBD196.

Nota: Un control pozitiv poate fi de asemenea inclus: un construct de ARN sintetic sau o probă clinică cu titru înalt care poate fi diluată. Acest lucru ajută la monitorizarea performanței secvențierii.

2. Amestecați următoarele componente într-o bandă-tuburi/placă PCR. Se amestecă ușor prin pipetare și se puls-centrifughează tubul pentru a colecta lichidul.

Component	Volum (uL)
LunaScript RT Supermix	2
Template RNA	8
Total	10

Nota: ARN viral dintr-o probă clinică ar trebui să fie între Ct 18-35. Dacă Ct este între 12-15, atunci diluați proba de 100 de ori în apă, dacă este între 15-18, atunci diluați de 10 ori. Acest lucru va reduce probabilitatea apariției inhibiției de substrat a PCR.

Nota: Pentru a preveni contaminarea pre-PCR, mastermix-ul trebuie adăugat în tuburile/placa PCR din hota pre-PCR, care trebuie curățată cu șervețele de decontaminare și sterilizată UV înainte și după utilizare.

Nota: Probele de ARN trebuie pipetate în hota de extracție/adăugarea probei, care trebuie curățată cu șervețele de decontaminare și sterilizată cu UV înainte și după utilizare.

3. Incubați după cum urmează:

25 °C 00:02:00

55 °C 00:10:00

95 °C 00:01:00

Menține la 4 °C

¹ Adaptat după <https://www.protocols.io/view/ncov-2019-sequencing-protocol-v3-locost-bh42j8ye?step=1>



4. Diluați amestecul de primeri 100μM 1:10 în apă de grad molecular, pentru a genera stocul de primeri de concentrație 10μM.

Nota: Primerii sunt utilizați la o concentrație finală de 15nM per primer. În acest caz, amestecul V3 de primeri conține 110 primeri în grupul 1 și 108 primeri în grupul 2, deci vor fi pipetați 4uL de amestec stoc de primeri 10uM per reacția de 25 uL.

Note: Pregătiți mai multe alicoturi de 100uL de diluții de primer de 120 uM și congelați-le (pentru a preveni degradarea sau contaminarea).

PCR MULTIPLEX 4H

1. Pregătiți cate două reacții PCR per probă, după cum urmează (în tuburi sau plăci). Se amestecă ușor prin pipetare și se puls-centrifugheaza pentru a colecta lichidul în partea de jos a tubului .

Component	Reacția 1 (uL)	Reacția 2 (uL)
5X Q5 Reaction Buffer	5	5
10mM dNTPs	0.5	0.5
Q5 Hot Start DNA Polymerase	0.25	0.25
V3 Pool 1 (10uM)	4	0
V3 Pool 2 (10uM)	0	4
Apa fără nucleaze	12.75	12.75
Total	22.5	22.5

or

Component	Reacția 1 (uL)	Reacția 2 (uL)
Q5 Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix	12.5	12.5
V3 Pool 1 (10uM)	4	0
V3 Pool 2 (10uM)	0	4
Apa fără nucleaze	6	6
Total	22.5	22.5

Nota: Master Mixul Q5 Hot Start High-Fidelity 2X poate fi utilizat în locul setului de componente din primul tabel. Reacțiile PCR pot fi scalate la ½, de asemenea, pentru a economisi costuri.

Nota: Pentru a preveni contaminarea pre-PCR, mastermix-ul trebuie să fie pipetat în hota pentru mastermix, care ar trebui să fie curățata cu șervețele de decontaminare și sterilizata cu UV înainte și după utilizare.

2. Se adaugă 2,5 uL ADNc în fiecare dintre reacțiile PCR, se amestecă ușor prin pipetare și se puls centrifugheaza pentru a colecta lichidul în partea de jos a tubului.

Nota: În fiecare reacție PCR pot fi adăugate până la 5 uL ADNc (în locul apei fără nucleaze) pentru a îmbunătăți amplificarea probelor cu titru scăzut. Utilizarea a 5 uL de ADNc va



necesita o reacție de 20 uL de ADNc și e posibil să provoace inhibare, așa că utilizați cu precauție .

Note: ADNc trebuie adăugat în hota de extracție, care trebuie curățată cu șervețele de decontaminare și sterilizată cu UV înainte și după utilizare.

3. Configurați următorul program pe aparatul pCR:

Etapa	Temperatura (*C)	Timp	Ciclu
Activare	98	00:00:30	1
Denaturare	98	00:00:15	25-35
Annealing/extensie	65	00:05:00	25-35
Mentine	4	Indefinit	1

Nota: Numărul de cicluri trebuie să fie 25 pentru Ct: 18-21 până la maximum 35 de cicluri pentru Ct 35.

Nota: Calibrarea aparatului pCR poate varia de la instrument la instrument. Dacă observați o pierdere a ampliconului 64, atunci reduceți temperatura de annealing/extensie la 63°C. Temperatura de denaturare de 95°C poate fi, de asemenea, utilizată și poate crește ușor randamentele PCR.

DILUȚIA PCR

10MIN

1. Etichetați tuburile/placa și combinați următoarele volume ale fiecărei reacții PCR (pentru 10 uL din fiecare probă).

	Component	Volume (uL)
1	Pool 1 PCR reaction	2.5
2	Pool 2 PCR reaction	2.5
3	Nuclease-free water	45
4	Total	50uL

Note: The PCR post-clean up concentration is typically around 100 Mass percent. This means we can pool them without quantification/normalisation to make a significant time saving. If you require very even barcode representation perform clean-up and normalise to 10 Mass percent then continue.

Note: Ampliconii trebuie adăugați în dulapul post-PCR, care trebuie curățat cu șervețele de decontaminare și sterilizate cu UV înainte și după utilizare..

NATIVE BARCODING (MARCAJ)

2H

A. Codați pool-urile de ampliconi folosind abordarea one-step (într-o singura etapa).

1. Într-o nouă bandă-tub/placă pentru PCR, configurați următoarea reacție pentru fiecare probă :

	Component	Volum (uL)
1	Dilutie PCR din etapa anterioara	3.3
2	Ultra II End Prep Reaction Buffer	1.2
3	Ultra II End Prep Enzyme Mix	0.5



4	Apa nuclease free	5
5	Total	10uL

Note: Make a master mix of end-preparation reagents and nuclease-free water and aliquot into strip-tube/plate to improve reproducibility.

2. Se incubează la temperatura camerei pentru 00:15:00

Se incubează la 65°C pentru 00:15:00

Se incubează pe gheață pentru 00:01:00

3. Într-un nou tub/placă PCR, pipetați următoarea reacție pentru fiecare probă:

	Component	Volum (uL)
1	End-preparation reaction mixture	0.75
2	NBXX barcode	1.25
3	Blunt/TA Ligase Master Mix	5
4	Apa nuclease free	3
5	Total	10uL

Note: Utilizați un cod de bare nativ de la EXP-NBD104 (1-12), EXP-NBD114 (13-24) sau EXP-NBD196 per probă. Utilizați 12 sau mai multe coduri de bare per bibliotecă sau nu va fi suficient material total pentru a obține randamente bune.

4. Pipetați împreună, într-un nou tub Eppendorf de 1,5 ml, toate reacțiile de marcaj.

Note: Dacă procesați 12-24 de probe, pipetați toate cele 10 uL ale fiecărei reacții native de marcaj. Dacă procesați 48 de probe, pipetați 5 uL din fiecare reacție native de marcaj. Dacă procesați 96 de eșantioane, pipetați 2,5 uL din fiecare reacție native de marcaj, astfel încât să nu depășească un volum final de 240 uL.

5. Adăugați 0,4x volum de perle SPRI în tubul de probă și amestecați ușor fie prin mișcare, fie prin pipetare. De exemplu, adăugați 96 uL margele SPRI la 240 uL reacții de coduri de bare într-un singur vas.

Nota: 0,4x volum de SPRI este suficient pentru a lega ampliconii de 400 bp; nu utilizați 1x deoarece acest lucru va avea ca rezultat un pellet excesiv de mare.

6. Se amestecă prin vortexare urmata de puls-centrifugare pentru a colecta tot lichidul de la fundul tubului. Incubați pentru 00:05:00 la temperatura camerei.

7. Așezați tubul pe un suport magnetic și se incubează timp de 00:02:00 sau până când tot supernatantul este limpede. Îndepărtați cu grijă și aruncați supernatantul, având grijă să nu atingeți pelletul.

8. Adăugați 250 uL SFB și resuspendați pelletul complet prin amestecarea cu pipeta urmat de puls-centrifugare pentru a colecta pelletul în partea inferioară a tubului; așezați-l apoi pe magnet. Îndepărtați supernatantul.



Note: SFB va elimina excesul de adaptor fără a deteriora complexe adaptor-proteine. Nu folosiți etanol 70% în această etapă!

9. Repetați pasul 8 pentru o a doua spălare SFB. Centrifugați în puls -> îndepărtați orice SFB rezidual.

Nota: Nu trebuie să lăsați pelletul să se usuce la aer.

10. Adăugați 200 uL de etanol 70% la temperatura camerei pentru a spăla pelletul. Îndepărtați cu grijă și aruncați etanolul, având grijă să nu atingeți pelletul.

Note: Efectuați doar o singură spălare cu etanol 70%.

11. Puls-centrifugare pentru a colecta tot pelletul urmata de îndepărtarea (cu atenție!) a cât mai mult etanol rezidual posibil.

.

12. Incubați timp de 00:01:00 (sau până când peletul își pierde strălucirea) cu capacul tubului deschis; dacă peletul se usucă complet, va deveni dificil de resuspendat.

13. Resuspendați peletul în 30 uL 10 mM Tris pH 8,0, amestecați ușor prin pipetare și incubați pentru 00:02:00.

14. Așezați tubul pe un suport magnetic și transferați proba într-un tub Eppendorf curat de 1,5 ml.

B. Cuantificați 1 uL de ampliconi cu coduri de bare utilizând fluorometrul Qubit (testul dsDNA). Concentrația va varia în funcție de numărul și Ct de probe, dar aveți nevoie de aproximativ 30ng total în această etapă pentru a obține randamentul maxim.

C. Ligarea adaptorului AMII și spălare cu SFB .

1. Într-un tub Eppendorf nou de 1,5 mL, pipetați următoarele componente ale reacției de ligare a adaptorului AMII.

	Component	Volum (uL)
1	Barcoded amplicon pool	30
2	NEBNext Quick Ligation Reaction Buffer (5X)	10
3	Adapter Mix (AMII)	5
4	Quick T4 DNA Ligase	5
5	Total	50

2. Incubați la temperatura camerei pentru 00:20:00.

3. Adăugați 50 uL (1:1) de granule SPRI în tubul de 1.5mL amestecați ușor prin pipetare ura de puls-centrifugare.

Nota: Vortexați bine granule SPRI înainte de utilizare pentru a vă asigura că sunt bine resuspendate, soluția trebuie să aibă o culoare maro omogenă.



4. Incubați la temperatura camerei pentru 00:05:00.

5. Așezați tubul un suport magnetic și incubați timp de 00:02:00 sau până când granulele s-au peletizat iar supernatantul este complet limpede. Îndepărtați cu grijă și aruncați supernatantul, având grijă să nu atingeți granula de mărgel.

6. Adăugați 250 uL SFB și resuspendați pelletul complet prin amestecarea cu pipeta, urmat de puls-centrifugare îndepărtați supernatantul.

Nota: SFB va elimina excesul de adaptor fără a deteriora complexele adaptor-proteine. Nu folosiți etanol 70%!

7. Repetați pasul 6 (a doua spălare SFB).

8. Puls-centrifugare urmată de îndepărtarea SFB rezidual. Adăugați 150 uL EB (ONT) și resuspendați granulele prin amestecare cu pipeta.

Note: NU lăsați pelletul să se usuce în timpul spălărilor SFB!

9. Incubați la temperatura camerei pentru 00:02:00.

10. Așezați tubul pe un suport magnetic până când supernatantul este complet limpede. Transferați biblioteca finală într-un tub Eppendorf de 1,5 ml nou.

D. Cuantificați 1 uL din biblioteca finală utilizând fluorometrul Qubit (testul dsDNA). Concentrația va varia în funcție de numărul și Ct de probe; aveți nevoie de aproximativ 15 ng ARN total în această etapă pentru a obține randamentul maxim.



SECVENTIEREA PE MINION

1zi

A. Amorsați celula de secvențiere și apoi încărcați 15ng din biblioteca pregătită în etapa anterioară.

1. Dezghețați următorii reactivi la temperatura camerei apoi puneti-i pe gheață:

Sequencing buffer (SQB)

Loading beads (LB)

Flush buffer (FLB)

Flush tether (FLT)

2. Adăugați 30 uL FLT în tubul FLB și amestecați bine prin vortexare.

3. Dacă este necesar, plasați o nouă celulă de secvențiere în MiniION/MK1C, deschizând capacul și împingând celula cu atenție sub clema de prindere.

4. Luați o pipetă P1000 și setați volumul la 800 uL. Așezați vârful în orificiul de admisie al celulei de secvențiere și, ținând-o perpendicular pe planul acesteia, îndepărtați orice aer din orificiul de admisie, rotind butonul de volum în sens invers acelor de ceasornic.

Nota: Aveți grijă să nu eliminați atât de mult aer încât să afectați membrana de secvențiere.

5. Încărcați (cat mai încet și fără bruscări) 800 uL de FLB (plus FLT) în celula de secvențiere prin portul de admisie; încercând să evitați introducerea oricăror bule de aer. Așteptați 00:05:00

6. Deschideți portul SpotON ridicând ușor capacul SpotON.

7. Încărcați alți 200 uL de FLB (plus FLT) în celula de secvențiere prin portul de intrare; acest lucru va iniția sifonarea aerului din sistem prin portul SpotON.

8. Diluați librăria pregătită pentru secvențiere într-un tub nou:

	Component	Volum (uL)
1	SQB	37.5
2	LB	25.5
3	Librărie	12
5	Total	75

Note: Amestecați LB imediat înainte de utilizare, deoarece se depune rapid. Completați cu EB dacă este necesar un volum de librărie sub 12 μL.

10. Amestecați ușor biblioteca diluata prin pipetare în sus și în jos, chiar înainte de încărcarea pe celula.



11. Adăugați picătură cu picătură cei 75uL de bibliotecă diluata în celula de secvențiere prin portul SpotON. Asigurați-vă că fiecare picătură este sifonată în port înainte de a o adăuga pe următoarea.

12. Înlocuiți ușor capacul portului de eșantionare SpotON, asigurându-vă că intră în portul SpotON, închideți portul de admisie și închideți capacul MinION.

B. Începeți rularea secvențierii utilizând MinKnow

Observație: Dacă utilizați live basecalling asigurați-vă că activați barcoding-ul cu două terminații în setările de apel de bază.

1. Conectați MinION /Mk1C la o sursa de curent și așteptați detectarea celulei de secvențiere.

2. Alegeți 'FLO-MIN106' din meniul vertical, apoi selectați celula de secvențiere astfel încât să apară o bifă.

3. Faceți clic pe butonul "Experiment nou" din partea stângă jos a ecranului.

4. Pe ecranul pop-up Experiment nou, selectați parametrii de rulare pentru experiment din filele individuale:

Experiment: Denumiți secvențierea în câmpul experimentului, lăsați câmpul eșantion necompletat.

Kit: Selection: Selectați LSK109 dacă nu există nicio opțiune pentru barcoding (NBD104).

Run Options: Setați durata de secvențiere la 6-10 ore (o puteți opri după ce au fost colectate suficiente date determinate folosind RAMPART).

Basecalling: Lăsați basecalling ON, dar selectați "basecalling rapid".

Output: Numărul de fișiere pe care MinKNOW le va scrie într-un singur folder. În mod implicit, acest lucru este setat la 4000, dar poate fi redus pentru a face actualizarea mai frecvent.

Click pe 'Start run'.

5. Monitorizați progresul secvențierii utilizând interfața MinKNOW.