

Aug 21, 2024

Bakteriel WGS - SSI

DOI

<https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.5qpvo3r7bv4o/v1>



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

¹Department of Sequencing and Bioinformatics; ²Statens Serum Institut

SSI - SB - Sequencing Core Facility
Tech. support email: Sekventeringsenheden@ssi.dk



Sekventeringsenheden SB

Sequencing and Bioinformatics

Create & collaborate more with a free account

Edit and publish protocols, collaborate in communities, share insights through comments, and track progress with run records.

Create free account

OPEN  ACCESS



DOI: <https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.5qpvo3r7bv4o/v1>

Protocol Citation: Theis Hass Thorsen, Sekventeringsenheden SB 2024. Bakteriel WGS - SSI. **protocols.io**
<https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.5qpvo3r7bv4o/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: August 08, 2023

Last Modified: August 21, 2024

Protocol Integer ID: 86116

Keywords: Sequencing, Bacterial sequencing, Bacterial WGS, WGS, NGS, Genome, Bacterial genome, SSI, Statens Serum Institut, MiSeq, Illumina, Bacteria, bacterial isolate, isolates with large genome, sequencing core facility, nextseq for the sequencing, throughput sequencing, sequencing platform, sequencing, genome, ssi method, large genome, isolate

Funders Acknowledgements:

European Health and Digital Executive Agency (HaDEA)

Grant ID: 101111879

Disclaimer

This method is a scaled version of the original 'Illumina Nextera XT DNA Library Prep'.
See under *References* for a link to the original protocol.

Abstract

Method used at Sequencing Core Facility - Statens Serum Institut for sequencing of bacterial isolates.

This protocol is specified for high-throughput sequencing of 96 isolates (sometimes less depending on the number of isolates with large genomes). Furthermore, the genomes are sequenced on the Illumina sequencing platform using a MiSeq and the MiSeq 500-cycle v2 kit.

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

Note, it is also possible to use a 300-cycle Mid Output Kit v2.5 on a NextSeq for the sequencing, but this will not be covered in this protocol.

Image Attribution

Statens Serum Institut, www.ssi.dk.

Guidelines

For at begrænse krydskontaminering, skift spidser stort set efter hver brug.



Materials

Instrumenter:

- Køl/Frys
- Stinkskab
- Vortex
- Centrifuge (1,5 mL rør, PCR rør/plader)
- Qubit 4 Fluorometer (Invitrogen - Thermo Fisher Scientific (TFS))
- PCR-maskine
- Tapestation 4200 (Agilent Technologies)
- Miseq (Illumina)

Redskaber:

- Beskyttelsesbriller
- Pipetter - p10, p100, p200, p1000, p5000, p10000
- Multikanalpipette - 0,2-10 µL
- Magnetholder (96-brønds plader)

Forbrugsvarer:

- 1,5 mL "Lo-bind" rør
- 50 mL rør
- 96-brønds "Lo-bind" PCR-plader
- 8-rør "thin-walled" PCR-strimmel
- Qubit rør (#Q32856, Invitrogen - TFS)
- Pipettespidser (p10, p100, p200, p1000, p5000, p10000)
- "Seals"
- Propper til index rør (FC-131-2001 - FC-131-2004, Illumina)
- Fnugfri linse renseservietter
- Handsker (gerne med høj gennembrudstid)
- Is



Protocol materials

- ✕ Amplicon Tagment Mix **Illumina, Inc. Catalog #FC-131-1096**
- ✕ Tagment DNA Buffer **Illumina, Inc. Catalog #FC-131-1096**
- ✕ Neutralize Tagment Buffer **Illumina, Inc. Catalog #FC-131-1096**
- ✕ Nextera PCR Master Mix **Illumina, Inc. Catalog #FC-131-1096**
- ✕ Resuspension Buffer **Illumina, Inc. Catalog #FC-131-1096**
- ✕ AMPure XP beads **Beckman Coulter Catalog #A63881**
- ✕ EtOH
- ✕ Nuclease-free Water
- ✕ 1 M NaOH
- ✕ HT1 - Hybridization Buffer **Illumina, Inc. Catalog #MS-102-2003**
- ✕ PhiX Control v3 **Illumina, Inc. Catalog #FC-110-3001**
- ✕ 10 mM Tris-Cl pH 8.5 with 0.1% Tween-20 **Teknova Catalog #T7724**
- ✕ MiSeq 500 cycle Kit v2 - Reagent Cartridge **Illumina, Inc. Catalog #MS-102-2003**
- ✕ PR2 - Incorporation Buffer **Illumina, Inc. Catalog #MS-102-2003**
- ✕ D5000 ScreenTape **Agilent Technologies Catalog #5067-5588**
- ✕ D5000 Reagents **Agilent Technologies Catalog #5067-5589**
- ✕ MiSeq 500 cycle Kit v2 - Flow Cell **Illumina, Inc. Catalog #MS-102-2003**
- ✕ MilliQ water
- ✕ 1 M NaOH
- ✕ Index adapters **Illumina, Inc. Catalog #FC-131-2001 - FC-131-2004**
- ✕ Qubit™ 1X dsDNA HS Assay Kit **Invitrogen - Thermo Fisher Catalog #Q33231**

Safety warnings

- ! Arbejd forsigtigt og med den/de korrekte beskyttelsesværn (laboratoriekittel, handsker og beskyttelsesbriller, stinkskaab) når der arbejdes med følgende reagenser:

Tagment DNA Buffer



Kronisk sundhedsfare



Sundhedsfare

Tagment DNA Buffer SDS: https://illumina-sds.thewerco.com/External/MyDocuments/DownloadSingleFile?content=FBB45282-DBA4-4F0F-A31C-8C19AA529A01_FC-131-1096_PDF

N,N-Dimethylformamid



Kronisk sundhedsfare



Sundhedsfare

N,N-Dimethylformamid SDS: <https://illumina-sds.thewerco.com/External/MyDocuments/DownloadSingleFile?content=C8A4CCCB-3E11-42B4-BF6E->

[7B6217FBEE2D_MS-102-2003_PDF](#)

Before start

Fortynding af DNA-oprensninger

Inputkoncentrationen for de forskellige DNA-oprensninger kan være organismespecifik. Det vil sige at der kan være forskel på, hvor meget DNA der skal bruges til analysen ved sekventering af f.eks. en Salmonella vs Clostridium.

En ting der skal overvejes, inden der startes en WGS-kørsel, er hvor mange isolater det er muligt at samle i én kørsel, og dermed hvor mange Mbp der bruges til den endelige sekventering. I denne protokol benyttes en "500 cycles" kassette (MiSeq), der max. kan "loades" med 90 Mbp.

Til denne protokol fortyndes inputkoncentrationerne for DNA-oprensningerne normalt til 0,3 til 0,5 ng/μL. DNA-oprensningerne kan med fordel fortyndes i en 96-brønds PCR-plade, hvor koncentrationerne kan bestemmes med en Fluostar Omega Platereader.

Tagmentering af input-DNA

1m

1 Find følgende komponenter frem.

Komponenter opbevaret på frost:

 Amplicon Tagment Mix **Illumina, Inc. Catalog #FC-131-1096**

 Tagment DNA Buffer **Illumina, Inc. Catalog #FC-131-1096**

- Tø op på is. Vend de optøede rør 3-5 gange og centrifuger derefter kortvarigt.

Safety information

Tagment DNA Buffer



Kronisk sundhedsfare



Sundhedsfare

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

Komponent opbevaret ved stuetemperatur:

 Neutralize Tagment Buffer **Illumina, Inc. Catalog #FC-131-1096**

- Tjek for bundfald. Hvis der er bundfald til stede, vortex indtil alle partikler er resuspenderet.

2

Safety information

Følgende arbejde bør foregå i et stinkskab, da **Tagment DNA Buffer** indeholder **N,N-Dimethylformamid**.
Arbejd med korrekt personbeskyttelse (kittel, briller og handsker med høj gennembrudstid).

Navngiv en standard 96-brønds PCR-plade med "NTA" + et unik ID.

Tilføj  5 µL  Tagment DNA Buffer **Illumina, Inc. Catalog #FC-131-1096** til brøndene ved hjælp af en multikanalpipette.

3 Overfør prøverne -  2.5 µL DNA pr. prøve fra fortyndingspladen (justeret til [M] 0.3-0.5 ng/µL).

4 Tilføj  2.5 µL  Amplicon Tagment Mix **Illumina, Inc. Catalog #FC-131-1096** til hver brønd.

5 Brug en multikanalpipette indstillet på 10 µl til at blande hver prøve forsigtigt 5 gange.

6 "Seal" pladen og centrifuger den ved  280 x g, 20°C, 00:01:00 .

1m

7 Placer pladen i en PCR-maskine og kør følgende opvarmningsprogram:

"Tagmentation" program

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

"Tagmentation" program

8 Så snart temperaturen når  10 °C , centrifuger pladen kortvarigt og fjern forseglingen, tilsæt herefter  2.5 µL

 Neutralize Tagment Buffer **Illumina, Inc. Catalog #FC-131-1096** til hver brønd.



9 Brug en multikanalpipette indstillet på 10 µl til at blande hver prøve mindst 5 gange.

10 "Seal" pladen og centrifuger den ved 280 x g, 20°C, 00:01:00 .

1m

11 Inkubér pladen i 00:05:00 stuetemperatur .
Fortsæt herefter med næste trin.

5m

PCR amplificering af biblioteker

4s

12 Find følgende komponenter frem.

45s

Komponenter opbevaret på frost:

Index adapters **Illumina, Inc. Catalog #FC-131-2001 - FC-131-2004**

- Optø ved stuetemperatur. (Rør) Vortex for at blande og centrifuger derefter ved

12000 rpm, 00:00:15 . [Plader] Spin 00:00:30 før brug.

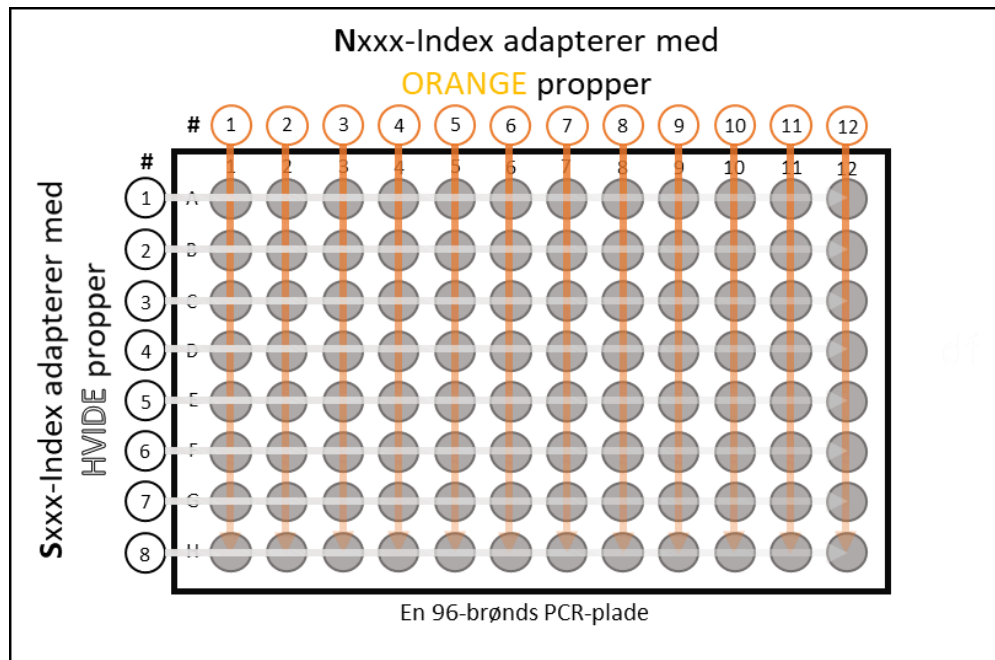
Nextera PCR Master Mix **Illumina, Inc. Catalog #FC-131-1096**

- Optø på is i 20 minutter.

13 Tilsæt 7.5 µL Nextera PCR Master Mix **Illumina, Inc. Catalog #FC-131-1096** til
hver brønd i NTA-pladen.
"Seal" og centrifuger pladen i ~ 00:00:04 .

4s

14 Tilsæt 2.5 µL fra den første **Nxxx**-indeks primer (orange propper) til hver brønd i
den første kolonne på NTA-pladen. Gør derefter det samme med den anden indeks
primer i den anden kolonne, og fortsæt til alle brønde har fået indeks (se Figur 1).
Smid den gamle prop ud og sæt en ny på (dette gøres for at forhindre kontaminering af
primerrøret).



Figur 1: Oversigt over hvor de forskellige indeks adapterer skal tilsættes i NTA-pladen. Nxxx-indeks adapterer (orange propper) tilsættes kolonnevis, og Sxxx-indeks adapterer (hvide propper) tilsættes rækkevis.

- 15 Tilsæt  2.5 µL fra den første Sxxx-indeks primer (hvide propper) til hver brønd i den første række på NTA-pladen. Gør derefter det samme med den anden indeks primer i den anden række, og fortsæt til alle brønde har fået indeks (se Figur 1). Smid den gamle prop ud og sæt en ny på (dette gøres for at forhindre kontaminering af primerrøret).
- 16 Bland indholdet i brøndene 3-5 gange med en multikanalpipette indstillet til 10 µL. "Seal" pladen. Spin ned ved  280 x g, 00:01:00 .
- 17 Kør NTA-pladen på følgende PCR-program:

	Temp.	Tid	Runder
	72°C	03:00	1
	95°C	00:30	1
	95°C	00:10	12
	55°C	00:30	
	72°C	00:30	
	72°C	05:00	1

1m



	Temp.	Tid	Runder
	10°C	∞	1

PCR-program

18 Sikkert stoppested

Hvis det ikke er planlagt at fortsætte direkte efter denne PCR, skal pladen enten blive i termocyklern ved 10 grader natten over eller opbevares i køleskabet i op til to dage.

Rengøring af PCR-produkter

1m

19 Find følgende komponenter frem.

Komponenter opbevaret på frost/køl:

⊗ Resuspension Buffer **Illumina, Inc. Catalog #FC-131-1096**

- Tø op og bring til stuetemperatur. Vortex for at blande. "Resuspension Buffer" kan opbevares ved 2°C til 8°C efter den indledende optøning.

Komponenter opbevaret på køl:

⊗ AMPure XP beads **Beckman Coulter Catalog #A63881**

- Lad stå ved stuetemperatur i 30 minutter. Vortex og vend for at blande.

20 Lav op til 50 mL 80 % (v/v) EtOH fra absolut ethanol - nok til 96 prøver.

21 Centrifuger NTA-pladen ved 280 x g, 00:01:00 for at samle indholdet i bunden af brøndene.

1m

22 Vortex AMPure XP beads **Beckman Coulter Catalog #A63881** .

"Beads" skal have stuetemperatur, før der fortsættes.

23 Tilsæt 11.25 µL AMPure XP beads **Beckman Coulter Catalog #A63881** til hver brønd i NTA-pladen.

24 Bland forsigtigt hver brønd 10 gange (brug en multikanalpipette sat til 50 µL).

25 Inkubér NTA-pladen i 00:05:00 stuetemperatur .

5m



- 26 Placér pladen på en magnetisk holder i ~ 00:02:00 - eller indtil supernatanten er helt klar. 2m
- 27 Lad NTA-pladen blive på den magnetiske holder.
Indstil en 200 µL multikanalpipette til 40 µL, fjern forsigtigt supernatanten og kassér den.
VIGTIGT: Undgå at forstyrre pellet. Hvis pellet forstyrres skal supernatanten pipetteres tilbage i brøndene og stå i yderligere 2 minutter.
- 28 Vask prøverne **to gange** på følgende måde:
- 28.1 Imens NTA-pladen bliver på den magnetiske holder tilsættes 200 µL friskblandet [M] 80 % (v/v) EtOH - **bland ikke prøverne**.
- 28.2 Inkubér prøverne i 00:00:30 . 30s
- 28.3 Fjern og kassér supernatanten uden at forstyrre pellet.
(Efter **1. vask** [go to step #28.1](#))
- 29 Brug en 10 µL multikanalpipette til at fjerne de sidste rester af EtOH fra brøndene - vær stadig forsigtig med ikke at forstyrre pelleten.
- 30 Lad NTA-pladen stå på den magnetiske holder i 00:15:00 for at lufttørre pelleten. 15m
- 31 Fjern NTA-pladen fra den magnetiske holder og tilsæt 22 µL Resuspension Buffer **Illumina, Inc. Catalog #FC-131-1096** til hver brønd.
- 32 Bland forsigtigt 10 gange med en multikanalpipette.
- 33 Inkubér pladen i 00:05:00 stuetemperatur . 10m
Anbring derefter pladen på den magnetiske holder i 00:05:00 indtil supernatanten er helt klar.



34 Navngiv en ny plade "CAN" (Clean Amplified Plate) + et unik ID.

35 Overfør  20 µL supernatant fra NTA-pladen til den nye CAN-plade.

Note

Hvis der er spor af "AMPure beads" i suspensionen (ses typisk som en svag farvning af supernatanten), pipetteres denne tilbage og inkuberes i yderligere  00:02:00 på magnet holderen. NTA-pladen kan kasseres efter en vellykket overførsel af supernatanten.

36 Sikkert stoppested

Hvis det ikke er planlagt at fortsætte direkte, kan CAN-pladen opbevares ved -15 til -25°C i op til 1 uge, ellers fortsæt til trin 37.

37 Bestem DNA-koncentrationen i CAN-pladen med et

Equipment

Qubit 4

NAME

Fluorometer

TYPE

Invitrogen

BRAND

Q33238

SKU

<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/Q33238>^{LINK}



med et

 Qubit™ 1X dsDNA HS Assay Kit **Invitrogen - Thermo Fisher Catalog #Q33231** (mål

på 2 µL).

Note

Hvordan man måler på Qubit (2 μL prøve)

- Tag et antal Qubit-rør (Invitrogen - Thermo Fisher #Q32856) frem matchende antallet af prøver + 2 mere til standarder.
- Pipetter følgende volumener af "working solution" til de to typer af rør:  198 μL til alle prøverør samt  190 μL til de to rør til standarder.
- Tilføj  10 μL af hhv. standard #1 og #2 til hvert sit rør til standarderne med "working solution" (den totale volumen skal være 200 μL).
- Tilføj  2 μL fra hver prøve til hvert sit prøverør med "working solution" (den totale volumen skal være 200 μL).
- 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 sørg for at "original sample volume" er sat til **2 μL** , 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.

Normalisering og "final pool"

- 38 Under normaliseringen beregnes der, hvor meget der skal overføres fra hver enkelte prøve til en "final pool", således at hver prøve sekventeres med tilstrækkelig dybde. Det gøres ved hjælp af et excel-ark hvor beregningerne er "automatiseret" og tager forhold til bakterierne's gns. genom størrelse og prøve koncentrationerne samt den ønskede slutkoncentration og slutvolumen på "final pool".

Download og benyt følgende excel-ark:

 Normalisering og final pool - SSI.xlsx 32.5KB

- 38.1 Under *Trin 1* indtastes:
- Batch navn
 - Navn på eksperiment
 - Dato for det udførte arbejde
 - Laboranten der udfører arbejdet
- 38.2 Under *Trin 2* indtastes for hver prøve, ud for den rette brøndposition:
- Prøve ID
 - Organismens latinske navn



Den tilhørende genom størrelse tilføjes automatisk baseret på organismens navn.

38.3 Under *Trin 3* indtastes:

- Den ønskede slutkoncentration (i nM) for "final pool" (i denne protokol er den sat til 4 nanomolar (nM)).
- Den ønskede "pooling" volumen (i uL) for "final pool" (i denne protokol er den sat til 300 μ L).

38.4 Under *Trin 4* indtastes:

- De målte koncentrationer for prøverne i ng/uL (blå kolonne)

Værdierne i de efterfølgende kolonner udregnes automatisk.

38.5 Hvis en prøve har en koncentration < 1 ng/uL, er koncentrationen for lav. I det/de tilfælde skal den tilhørende værdi i kolonne *x grr* (rød kolonne) ændres til '0'. Hvilket fjerner prøven fra de videre beregninger, og der bliver ikke overført noget fra prøven til den endelige "final pool".

38.6 Overfør for hver prøve den tilhørende beregnede volumen angivet i kolonnen *uL fra prøve til "final pool"* (grøn kolonne) til et nyt 1,5 mL rør. Dette er "**final pool**".

Note

Der er kun **18 uL** tilbage af hver prøve i CAN-pladen (efter Qubit-målingen). Hvis der skal bruges mere end 18 uL - prøv at sænke den ønskede slutvolumen for "final pool".

Note

Hvis der er spor af "AMPure beads" i "final pool", kan røret sættes på en magnetholder i ~ 00:05:00 , eller indtil væsken er klar, hvorefter hele volumen (uden "beads") kan overføres til et nyt 1,5 mL rør.

39 For at være sikker på at "final pool" har den ønskede molær slutkoncentration, lav endnu en koncentrationsbestemmelse på følgende måde:

39.1 Bestem DNA-koncentrationen i "final pool" med et Qubit fluorometer (se trin 37).



39.2 Bestem den gns. fragmentstørrelse i "final pool" - f.eks. på en

Equipment

4200 TapeStation System

NAME

Automated electrophoresis platform

TYPE

Agilent

BRAND

G2991BA

SKU

<https://www.agilent.com/en/product/automated-electrophoresis/tapestation-systems/tapestation-instruments/4200-tapestation-system-228263>

LINK

med følgende komponenter:

 D5000 ScreenTape **Agilent Technologies Catalog #5067-5588**

 D5000 Reagents **Agilent Technologies Catalog #5067-5589**

Note

Se under *References* for en "quick guide" til Tapestation D5000 screen tapes.

Fordelen ved at bestemme den gns. fragmentstørrelse er:

- Det er muligt visuelt at se, om der er noget galt med biblioteket, inden der fortsættes til sekventeringen.

39.3 Åben excel-arket: *Normalisering og final pool* - *SSI*.

Under *Trin 5* indtastes:

- DNA-koncentrationen i "final pool" (i ng/μL)
- Den gns. fragmentstørrelse i "final pool" (i bp)

Den reelle molær slutkoncentration udregnes automatisk, samt om det er nødvendigt at fortynde "final pool" yderligere.

39.4 Hvis det er nødvendigt, fortynd "final pool" med

 Resuspension Buffer **Illumina, Inc. Catalog #FC-131-1096** som nævnt under *Trin 5*.



Sekventering

40 Find følgende reagenser frem.

Opbevares ved stuetemperatur:

⊗ 10 mM Tris-Cl pH 8.5 with 0.1% Tween-20 **Teknova Catalog #T7724**

Opbevares på køl:

⊗ 1 M NaOH

⊗ PR2 - Incorporation Buffer **Illumina, Inc. Catalog #MS-102-2003**

⊗ MiSeq 500 cycle Kit v2 - Flow Cell **Illumina, Inc. Catalog #MS-102-2003**

Opbevares på frost:

⊗ PhiX Control v3 **Illumina, Inc. Catalog #FC-110-3001**

⊗ HT1 - Hybridization Buffer **Illumina, Inc. Catalog #MS-102-2003**

- Stil på is når det er tøet op.

⊗ MiSeq 500 cycle Kit v2 - Reagent Cartridge **Illumina, Inc. Catalog #MS-102-2003**

- Kan sættes på køl dagen før for at tø.

Note

Det er også muligt at sekventere biblioteket på en NextSeq 500/550 med et NextSeq 500/550 Mid Output Kit v2.5 (300 Cycles). Men dette vil ikke blive dækket i denne protokol.

Denaturering og fortynding af bibliotek

41 Lav en frisk 1M 0.2 Mass Percent fortynding af NaOH.

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

⊗ 1 M NaOH .

Vortex kort.

42 Overfør 5 µL fra "final pool" til et nyt 1,5 mL rør.

43 Tilsæt 5 µL 0.2 M NaOH.



- 44 Vortex og centrifuger ved 280 x g, 00:01:00 . 1m
- 45 Inkubér i 00:05:00 stuetemperatur . 5m
- 46 Tilsæt 990 μL afkølet
 HT1 - Hybridization Buffer **Illumina, Inc. Catalog #MS-102-2003** til røret
(koncentrationen er nu 20 picomolar (pM)).
- 47 Vortex og centrifuger kortvarigt.
- 48 Sæt røret på is.
- 49 Fortynd til 10 picomolar (pM) i et nyt 1,5 mL rør ved at blande 300 μL
 20 picomolar (pM) denatureret bibliotek med 300 μL afkølet
 HT1 - Hybridization Buffer **Illumina, Inc. Catalog #MS-102-2003** .
- 50 Vend røret et par gange og centrifuger kortvarigt.
Sæt røret på is.
- 51 Hvis **det ønskes** at tilsætte en PhiX kontrol til det denatureret bibliotek inden sekventeringen - fortsæt til **trin 52**.

Hvis det **ikke ønskes** at tilsætte en PhiX kontrol - gå til **trin 61**.
- 52 I et 1,5 mL rør, miks 2 μL 10 nanomolar (nM)
 PhiX Control v3 **Illumina, Inc. Catalog #FC-110-3001** med 3 μL
 10 mM Tris-Cl pH 8.5 with 0.1% Tween-20 **Teknova Catalog #T7724**
- 53 Tilsæt 5 μL 0.2 Mass Percent NaOH til røret.
- 54 Vortex og centrifuger ved 280 x g, 00:01:00 . 1m



55 Inkubér i 00:05:00 stuetemperatur .

5m

56 Tilsæt 990 μL afkølet

HT1 - Hybridization Buffer **Illumina, Inc. Catalog #MS-102-2003** til røret

(koncentrationen er nu 20 picomolar (pM)).

Note

Den 20 picomolar (pM) denatureret PhiX kontrol kan opbevares på -20 °C op til 3 uger.

57 Overfør 375 μL 20 picomolar (pM) PhiX kontrol til et nyt 1,5 mL rør.

Tilsæt 225 μL afkølet

HT1 - Hybridization Buffer **Illumina, Inc. Catalog #MS-102-2003** til røret

(koncentrationen er nu 12.5 picomolar (pM)).

58 Fjern 6 μL fra det 10 picomolar (pM) denatureret bibliotek (prøverne).

59 Tilsæt 6 μL 12.5 picomolar (pM) PhiX kontrol til det denatureret bibliotek (prøverne).

60 Vend røret et par gange og centrifuger kortvarigt.
Sæt røret på is.

MiSeq kørsel

61

Safety information



MiSeq 500 cycle Kit v2 - Reagent Cartridge **Illumina, Inc. Catalog #MS-102-2003**

indeholder **N,N-Dimethylformamid** (position 8 i kassetten).



Kronisk sundhedsfare



Sundhedsfare

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

Vend



MiSeq 500 cycle Kit v2 - Reagent Cartridge **Illumina, Inc. Catalog #MS-102-2003**

ti gange og  PR2 - Incorporation Buffer **Illumina, Inc. Catalog #MS-102-2003** fem gange for at blande reagenserne.

Sikre at alle reagenser er tørt op, er blandet og at der ikke er luftbobler i bunden af de forskellige reservoir.

62 På



MiSeq 500 cycle Kit v2 - Reagent Cartridge **Illumina, Inc. Catalog #MS-102-2003** ,

prik hul i folieforseglingen ved det markerede reservoir "Load Samples" med en ren 1 mL pipettespids.

63 Overfør hele **100 pM** 10 picomolar (pM) prøve biblioteket til reservoiret.

Undgå at røre ved folieforseglingen.

64 Tryk på *Sequence* på skærmen af

Equipment

MiSeq

NAME

Sequencer

TYPE

illumina

BRAND

SY-410-1003

SKU

<https://www.illumina.com/systems/sequencing-platforms/miseq/order-miseq.html>

LINK



65 Vælg én af tre "setup" muligheder:

65.1 **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 **8**,

Read 1 og *Read 2* sættes til **251**.

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.

Tryk på *Next*.

65.2 **Sample Sheet**

Note

På forhånd udfyldes et "sample sheet" med alle de ønskede indstillinger og prøveinformationer.
I denne protokol køres der med **paired end**,
og
Read 1 og *Read 2* sættes til **251**.
Index 1 og *Index 2* indstilles automatisk til 8, når "sample sheet" uploades på instrumentet.

Eksempel på "sample sheet":



Eksempel på MiSeq Sample sheet.... 12.7KB

Noter:

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

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

Tryk på *Next*.

65.3 **Manual**

Vælg **paired end**.

Indtast følgende informationer:

Index 1 og *Index 2* sættes til **8**,
Read 1 og *Read 2* sættes til **251**.

Vælg den ønskede "output folder".

"Browse" og vælg det klargjorte "sample sheet" (skal indeholde prøve ID og index' på alle prøverne).

Se trin 65.2 for en skabelon til et "sample sheet".

Tryk på *Next*.

66

Inden  MiSeq 500 cycle Kit v2 - Flow Cell Illumina, Inc. Catalog #MS-102-2003 sættes i instrumentet.

Skyl flow cellen grundigt men forsigtigt med  MilliQ water for at skylle buffer og eventuelle saltrester af flow cellen.

67

Tør forsigtigt men grundigt flow cellen med fnugfri linse renseservietter.



Vær meget forsigtig omkring de sorte flow celle porte samt glasset på flow cellen.

- 68 Skyl glasset på flow cellen med [M] 70 % (v/v)  EtOH **(undgå at ramme de sorte porte)**, og tør det forsigtigt af igen med fnugfri linse renseservietter (der kan gemme sig meget i revnerne på flow cellen).

Vær sikker på at glasset er fri for striber, fingeraftryk, fnug og fibre.

- 69 Hold på kanterne af flow cellen **uden at røre ved glasset.**

Placér flow cellen i instrumentet som ansvist på skærmen.

Tryk på *Next*.

- 70 Åben lågen under skærmen.

- 71 Løft håndtaget til de to "sipper", som anvist på skærmen, indtil det låser på plads. (Håndtaget er placeret imellem de to flasker)

- 72 Fjern den gamle flaske med buffer (står i midten) og tøm affaldsbeholderen (står til højre).

- 73 Fjern låget fra  PR2 - Incorporation Buffer **Illumina, Inc. Catalog #MS-102-2003** .

- 74 Indsæt  PR2 - Incorporation Buffer **Illumina, Inc. Catalog #MS-102-2003** og den tomme affaldsbeholder på deres rette position som anvist på skærmen.

- 75 Sænk langsomt håndtaget til de to "sipper".
Sørg for at de to "sipper" sænkes ned i  PR2 - Incorporation Buffer **Illumina, Inc. Catalog #MS-102-2003** og affaldsbeholderen.

- 76 Tryk på *Next*.

- 77 Åben lågen til kølerummet (til venstre).

- 78 Fjern den gamle vaskekassette.



79 Hold

MiSeq 500 cycle Kit v2 - Reagent Cartridge Illumina, Inc. Catalog #MS-102-2003

i håndtaget i bagenden af kassetten ved Illumina mærket og skub den ind i kølerummet indtil den stopper.

80 Luk lågen til kølerummet.

81 Tryk på *Next*.

82 Tjek at "run parameters" passer og tryk på *Next*.

83 Når instrumentet er færdig med sit "pre-run check", tryk på *Start Run*.

Hvis "Start run after pre-run check" er valgt til under kørselsindstillingerne, begynder kørslen automatisk, når instrumentet er færdig med sit "pre-run check".

Hvor lang tid tager kørslen?

84 En kørsel med en

MiSeq 500 cycle Kit v2 - Reagent Cartridge Illumina, Inc. Catalog #MS-102-2003

tager ~39 timer.



Protocol references

Illumina Nextera XT DNA Library Prep:

<https://support-docs.illumina.com/LP/NexteraXTRef/Content/LP/FrontPages/NexteraXT.htm>

Illumina MiSeq System Denature and Dilute Libraries Guide - # 15039740 v10:

https://emea.support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/system_documentation/miseq/miseq-denature-dilute-libraries-guide-15039740-10.pdf

Illumina MiSeq System Guide - # 15027617 v06:

https://emea.support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/system_documentation/miseq/miseq-system-guide-15027617-06.pdf

D5000 ScreenTape Assay for TapeStation Systems - Quick Guide:

https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/D5000_QuickGuide.pdf