

Jan 04, 2024

Code-barres natif des amplicons (plaques 96 puits)

DOI

dx.doi.org/10.17504/protocols.io.81wgbxw61lpk/v1

Alex Shaw¹, Catherine Troman¹, Joyce Akello¹, Javier Martin², Nick Grassly¹, Erika Bujaki³

¹Imperial College London; ²Medicine and Healthcare products Regulation Authority; ³MHRA

Poliovirus Sequencing C...



Shannon Fitz

Imperial College London

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.81wgbxw61lpk/v1>

Protocol Citation: Alex Shaw, Catherine Troman, Joyce Akello, Javier Martin, Nick Grassly, Erika Bujaki 2024. Code-barres natif des amplicons (plaques 96 puits). [protocols.io https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.81wgbxw61lpk/v1](https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.81wgbxw61lpk/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 use this protocol and it's working

Created: December 13, 2023

Last Modified: April 19, 2024

Protocol Integer ID: 92257

Keywords: barres natif des amplicon, le protocole suivant concerne la préparation des amplicon, préparation des amplicon, vous avez des amplicon, flow cell appropriée

Funders Acknowledgements:

Bill and Melinda Gates Foundation

Abstract

Le protocole suivant concerne la préparation des amplicons pour le séquençage à l'aide du kit de codage à barres Oxford Nanopore Native version 14 avec 96 codes à barres (SQK-NBD114.96). Lorsque vous utilisez ce kit, vous devez vous assurer d'utiliser la Flow Cell appropriée (FLO-MIN114, R10.4.1), sinon vous rencontrerez des difficultés lors du démarrage de l'analyse et les résultats de séquençage ne seront pas précis.

Nous fournissons des estimations de ng de matériel requis pour ce protocole lors de l'amplification de la région VP1 de la poliomyélite, de la région de la capsidé (PanEV) ou de l'ensemble du génome (PanPV). Si vous avez des amplicons d'une taille différente de ceux-ci, vous pouvez calculer le ng requis à l'aide d'un calculateur en ligne tel que celui-ci : Poids en quantité molaire (pour les acides nucléiques) (bioline.com).

AVANT DE COMMENCER

Préparez environ 40 ml d'éthanol frais à 80 % avant de commencer. Cela devrait être suffisant pour l'ensemble du protocole.

Guidelines

Si vous avez de longs fragments, réduisez le pipetage (et le cisaillement potentiel) en feuilletant ou en inversant soigneusement les tubes ou les plaques pour mélanger les réactions et en les faisant tourner dans une centrifugeuse.

Materials

Ultrapure Distilled, Nuclease Free Water

Agencourt AmPure XP beads Catalog #A63880

NEBNext Quick Ligation Module - 20 rxns New England Biolabs Catalog #E6056S

NEBNext Ultra II End Repair/dA-Tailing Module - 96 rxns New England Biolabs Catalog #37546L

Native barcoding kit (96) Oxford Nanopore Technologies Catalog #SQK-NBD114.96

NEB Blunt/TA Ligase Master Mix Catalog #M0367

Ultrapure BSA Ambion Catalog #AM2616

Nanopore Flow Cell R10.4.1 Oxford Nanopore Technologies Catalog #FLO-MIN114

Troubleshooting

Préparation de l'ADN d'entrée

- 1 Laisser les billes AMPure se réchauffer à température ambiante, puis ajouter 0,8x le volume du mélange de réaction PCR à la réaction et pipeter doucement pour mélanger.

Par exemple, pour une réaction PCR de 25 µl, ajouter 15 µl de billes AMPure XP
- 1.1 Incuber sur un rotateur pendant 5 minutes à température ambiante.
- 1.2 Faites tourner l'échantillon et placer sur un aimant lorsqu'il soit claire et incolore. Gardez le tube sur l'aimant et pipettez le surnageant.
- 1.3 Maintenez l'aimant, lavez les billes avec 100 µl d'éthanol à 80 % sans perturber le granule. Retirer l'éthanol à l'aide d'une pipette et jeter. Répéter.
- 1.4 Centrifugez et replacez le tube sur l'aimant. Pipeter tout éthanol résiduel. Laisser sécher pendant 30 secondes.
- 1.5 Retirer le tube de l'étagère magnétique et remettre le granule en suspension dans 20 µl d'eau sans nucléase. Incuber pendant 2 minutes à température ambiante.
- 1.6 Peler les billes sur l'aimant, puis retirer et conserver 20 µl d'éluat (ou autant que possible) dans une nouvelle plaque PCR à 96 puits.
- 2 Quantifier l'ADN amplifié avec un kit "Qubit Broad Range dsDNA".
- 2.1 En bref, créer un master mix de 200 µl (199 µl de tampon, 1 µl de réactif Qubit) pour chaque échantillon + 2 standards + 10 %. Pour les deux standards, ajouter 190 µl du "master mix" à 10 µl de standard, et pour les échantillons, ajouter 198 µl du "master mix" à 2 µl d'échantillon. Vortexer tous les tubes standards et échantillons et incuber à température ambiante pendant 2 minutes avant de quantifier.
- 2.2 *Important - assurez-vous de choisir le kit vaste gamme sur le Qubit* Enregistrer la concentration d'ADN pour chaque échantillon.
- 3 Transférer 200 fmol d'ADN par échantillon dans une plaque à 96 puits propre et ajuster le volume à 12,5 ul avec de l'eau sans nucléase. Mélange doucement en pipetant. 200 fmol = ~155ng VP1, ~584ng PanEV, ~974ng PanPV

- 4 Centrifuger brièvement dans une centrifugeuse à plaques.

End-prep & dA-tailing

- 5 Préparez les réactifs suivants comme master mix pour le nombre d'échantillons + 10% supplémentaire :

	A	B
	Réactif	Volume (ul)
	Tampon de réaction Ultra II End-prep (Ultra II End-prep reaction buffer)	1.75
	Mélange d'enzymes Ultra II End-prep (Ultra II End-prep enzyme mix)	0.75

- 6 Ajouter 2,5 µl du mélange réactionnel à chaque échantillon.

- 7 Bien mélanger par pipetage et centrifuger dans une centrifugeuse à plaques.

- 8 Incuber 5 minutes à 20 °C et 5 minutes à 65 °C à l'aide du thermocycleur.

Ligation des codes-barres et mutualisation

- 9 Sélectionnez un code-barres natif unique pour chaque échantillon de l'analyse et décongelez à température ambiante, puis gardez-les sur de la glace.

- 10 Décongeler les billes AMPure à température ambiante. Mélanger les billes AMPure au vortex avant d'utiliser.

11 Dans chaque puits requis d'une plaque 96 puits, ajouter :

	A	B
	Réactif	Volume (ul)
	ADN préparé aux extrémités (end-prepped DNA)	3.75
	Code-barres natifs	1.25
	Blunt/TA Ligase Master Mix	5

12 Mélanger doucement en pipetant. Sceller la plaque et centrifuger.

13 Incuber la plaque pendant 20 minutes à température ambiante.

14 Ajouter 1µl d'EDTA dans chaque puit, mélanger par pipetage puis centrifuger brièvement.

15 Regroupez tous les échantillons dans un tube de 1,5 ml.

16 Préparez les billes AMPure XP pour utilisation; remettre en suspension au vortex.

17 Nettoyer et concentrer les échantillons regroupés en utilisant un volume de billes AMPure XP remises en suspension égale à 0,4x le volume de vos échantillons regroupés.

17.1 Ajouter les billes AMPureXP, pipeter pour mélanger. Incuber pendant 10 minutes à température ambiante.

17.2 Faites tourner l'échantillon et le granule sur une étagère magnétique lorsqu'il soit claire et incolore, puis pipettez le surnageant.

- 17.3 Gardez sur l'aimant et lavez les billes avec 700 µl d'éthanol à 80 %, puis retirer l'éthanol et jeter. Répéter.
- 17.4 Centrifugez et replacez le tube sur l'étagère magnétique. Pipeter tout éthanol résiduel. Laisser sécher pendant 30 secondes.
- 17.5 Remettre le granule en suspension dans 35 µl d'eau sans nuclease en effleurant le tube.
- 17.6 Incuber pendant 10 minutes à 37°C, en agitant le tube toutes les 2-3 minutes pour favoriser l'élution.
- 17.7 Pelletez les perles sur l'étagère magnétique jusqu'à ce qu'elles soient claires, puis conservez 35 uL dans un tube propre Eppendorf DNA LoBind de 1,5 ml.

Ligature de l'adaptateur

- 18 Décongelez les réactifs comme suit: Décongele le tampon de réaction de ligature rapide NEBNext (5X) (NEBNext Quick Ligation Reaction Buffer 5X), tampon d'élution (Elution Buffer - EB) et soit un tube de Long Fragment Buffer (LFB) pour les amplicons plus longues (<3kb) ou un tube de Short Fragment Buffer (SFB) pour maintenir toutes les différents tailles d'amplicons à température ambiante, mélanger au vortex, centrifuger et placer sur de la glace. Faites tourner l'adaptateur natif (Native Adaptor - NA) et la ligase T4 rapide (Quick T4 Ligase), mélangez par pipetage et placez sur de la glace.
- 19 Aux 30 uL d'échantillon à code-barres regroupé, ajoutez les réactifs suivants :

	A	B
	Adaptateur natif (Native Adapter - NA)	5 ul
	Tampon de réaction de ligature rapide NEBNext (5X) (NEBNext Quick Ligation Reaction Buffer 5X)	10 ul

	A	B
	ADN ligase rapide T4 (NEB Quick T4 DNA Ligase)	5 ul

- 20 Mélanger en tapotant le tube et centrifuger.
- 21 Incuber la réaction pendant 20 minutes à température ambiante.
- 22 Remettre les billes AMPure XP en suspension au vortex, puis ajouter 20 µl de billes AMPure XP à la réaction de ligature de l'adaptateur.
 - 22.1 Incuber pendant 10 minutes à température ambiante sur un rotateur.
 - 22.2 Faites tourner l'endroit sur une étagère magnétique, laissez les billes se sédimenter et pipetez le surnageant.
 - 22.3 Laver les billes en ajoutant 125 µL de LFB ou SFB, effleurer le tube pour remettre les billes en suspension, centrifuger puis remettre sur l'aimant pour granuler les billes. Pipeter le surnageant, puis répéter cette étape.
 - 22.4 Faites tourner le tube et remettez-le sur l'étagère magnétique. Pipeter le surnageant résiduel.
 - 22.5 Retirer le tube de l'étagère magnétique et remettre en suspension le granule dans 15 µl de tampon d'élution. Effleurez doucement le tube pour remettre le culot en suspension.
 - 22.6 Incuber à 37 degrés pendant 10 minutes, en effleurant doucement le tube toutes les 2-3 minutes pour favoriser l'élution de l'ADN.
 - 22.7 Centrifugez puis culottez les billes sur l'étagère magnétique, et retirez et conservez 15 µl d'éluat dans un tube propre de 1,5 ml. Jetez les billes granulées.
- 23 Quantifiez 1 µl de votre bibliothèque adaptée à l'aide d'un Qubit ou tapestation.

- 24 Ajoutez 20 fmol de votre bibliothèque dans un tube PCR de 0,2 ml et augmentez le volume jusqu'à 12 μ l à l'aide du tampon d'élution.
 Si vous avez besoin de diluer la bibliothèque pour faciliter le pipetage, vous pouvez la diluer dans un tampon d'élution. 20 fmol = ~16ng VP1, ~59ng PanEV, ~98ng PanPV

Amorçage et chargement de la Flow Cell MinION

- 25 Décongelez le tampon de séquençage (Sequencing Buffer - SB), les perles de bibliothèque (Library Beads - LIB), l'attache de cellule d'écoulement (Flow Cell Tether - FCT) et un tube de flux de cellule d'écoulement (Flow Cell Flush - FCF) à température ambiante et remettez-les dans la glace une fois décongelés. Mélanger les tubes de tampon de séquençage (Sequencing Buffer - SB), flux de cellule d'écoulement (Flow Cell Flush - FCF) et attache de cellule d'écoulement (Flow Cell Tether - FCT) au vortex, centrifuger et remettre dans la glace. Faites tourner le LIB une fois décongelé, puis remettez-le dans la glace.
- 26 Pour créer le mélange d'amorçage, ajoutez 30 μ L de FCT et 5 μ L de BSA (50 mg/ml) au tube de FCF, puis mélangez par pipetage.
- 27 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 couvercle d'amorçage, vérifiez s'il y a de l'air sous l'orifice. Retirez un petit volume en faisant tourner le piston de la pipette pour augmenter lentement le volume afin d'éliminer les bulles d'air (quelques μ L). Vérifiez visuellement qu'il y a un tampon continu du port d'amorçage à travers le réseau de capteurs.
- 28 Utilisez une pipette P1000 pour chargez 800 μ l du mélange d'amorçage dans la cellule à écoulement via le port d'amorçage, en évitant l'introduction de bulles d'air. Laissez une petite quantité de liquide à l'extrémité de la pointe de la pipette pour vous assurer de ne pas introduire d'air dans la cuve à circulation. Attendez 5 minutes.
- 29 Mélanger le contenu du tube LIB en pipetant juste avant de l'ajouter au mélange de bibliothèque suivant dans un tube de 1,5 ml:

	A	B
	Reactif	Volume (μ l)
	Bibliothèque d'ADN	12
	Tampon de séquençage	37.5

	A	B
	Billes de bibliothèque (LIB)	25.5

- 30 Terminez l'amorçage de la flowcell en ouvrant le couvercle du port SpotOn et en chargeant soigneusement 200 µl du mélange d'amorçage dans **le port d'amorçage**. Comme avant, laissez une petite quantité de liquide au fond de l'embout pour éviter l'introduction de bulles d'air.

Lors de l'ajout du mélange d'amorçage, vous pouvez voir une petite quantité de liquide monter par le port SpotOn. Si vous le faites, faites une pause et laissez le liquide refluer dans la flowcell avant de continuer à passer le mélange d'amorçage.

- 31 Mélangez délicatement la librairie préparée en la pipetant. Ajouter goutte à goutte 75 µl 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.
- 32 Replacez 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 replacez le couvercle MinION.
- 33 Ouvrez le logiciel ONT MinKNOW et suivez les étapes pour configurer et démarrer votre cycle de séquençage. Dans la section Démarrer, sélectionnez démarrer l'exécution et suivez les invites pour sélectionner le kit utilisé, définir la durée d'exécution et définir l'appel de base et le démultiplexage.