



Dec 09, 2025

## Détection directe du poliovirus et séquençage Nanopore (DDNS) - Selles V.7

DOI

<https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.kqdg31n6zl25/v1>

Alex Shaw<sup>1</sup>, Catherine Troman<sup>1</sup>, Joyce Akello<sup>1</sup>, Erika Bujaki<sup>2</sup>, Manasi Majumdar<sup>3</sup>, Shannon Fitz<sup>1</sup>, Ben Bellekom<sup>4</sup>, Aine OToole<sup>5</sup>, c.ansley<sup>1</sup>, rachel.colquhoun<sup>5</sup>, YASIR ARSHAD<sup>6</sup>, khurshida<sup>6</sup>, alammu<sup>6</sup>, Andrew Rambaut<sup>5</sup>, Javier Martin<sup>6</sup>, Nick Grassly<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Imperial College London; <sup>2</sup>MHRA; <sup>3</sup>National Institute for Biological Standards and Control; <sup>4</sup>Imperial College;

<sup>5</sup>University of Edinburgh; <sup>6</sup>WHO, Pakistan

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.kqdg31n6zl25/v1>



**Protocol Citation:** Alex Shaw, Catherine Troman, Joyce Akello, Erika Bujaki, Manasi Majumdar, Shannon Fitz, Ben Bellekom, Aine OToole, c.ansley , rachel.colquhoun , YASIR ARSHAD, khurshida , alammu , Andrew Rambaut, Javier Martin, Nick Grassly 2025. Détection directe du poliovirus et séquençage Nanopore (DDNS) - Selles V.7. **protocols.io**

<https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.kqdg31n6zl25/v1>

**Manuscript citation:**

DOI: 10.1128/JCM.00920-20

**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:** October 29, 2025

**Last Modified:** December 09, 2025

**Protocol Integer ID:** 231068

**Keywords:** nanopore sequencing, oxford nanopore v14 chemistry ligation, use with oxford nanopore v14 chemistry ligation, polio specific primer, direct detection of poliovirus, vp1 region of poliovirus, identification of poliovirus, poliovirus, sequencing reagent, oxford nanopore, journal of clinical microbiology, sequencing, clinical microbiology, gridion sequencer, specific primer, pcr, ddns, polio, stool, minion mk1b, sensitive direct detection, minion mk1d, détection directe du poliovirus et séquençage nanopore, direct detection of poliovirus, région vp1 du poliovirus par pcr, poliovirus, identification of poliovirus, rapides et sensibles du poliovirus, vp1 region of poliovirus, nanopore sequencing, polio specific primer, oxford nanopore v14 chemistry ligation, use with oxford nanopore v14 chemistry ligation, polio, journal of clinical microbiology, clinical microbiology, environmental surveillance sample

**Funders Acknowledgements:**

**Gates Foundation**

Grant ID: OPP1171890

**Gates Foundation**

Grant ID: OPP1207299

## Abstract

Ce protocole est une mise à jour du protocole décrit dans l'article « Détection et identification directes rapides et sensibles du poliovirus à partir d'échantillons de selles et de surveillance environnementale par séquençage nanopore » de Shaw et al. paru dans le Journal of Clinical Microbiology (2020), DOI : 10.1128/JCM.00920-20. Il est communément appelé détection directe du poliovirus par séquençage nanopore (DDNS).

Ce protocole vise à amplifier la région VP1 du poliovirus par PCR semi-nichée à l'aide d'une amorce pan entérovirus et d'amorces spécifiques à la polio, puis à amplifier la région VP1 à l'aide d'un ensemble d'amorces spécifiques à la polio. Nous utilisons des amorces à code-barres, ce qui simplifie grandement la préparation ultérieure de la bibliothèque. Des contrôles de qualité sont inclus dans le protocole. Suivre les étapes de contrôle qualité au fur et à mesure garantit la validité de vos résultats et facilite la résolution des problèmes en cas de besoin.

Ce protocole est destiné à être utilisé avec les réactifs de séquençage par ligation chimique Oxford Nanopore v14 et peut être utilisé avec le séquenceur MinION Mk1B, MinION Mk1D, ou GridION.

This protocol is a translated version of Direct Detection of poliovirus and Nanopore Sequencing (DDNS) - Stool V.7

**Abstract:** This protocol is an update from the protocol described in the paper "Rapid and sensitive direct detection and identification of poliovirus from stool and environmental surveillance samples using nanopore sequencing" by Shaw et al in the Journal of Clinical Microbiology (2020), DOI: 10.1128/JCM.00920-20 and is commonly known as Direct Detection of Poliovirus by Nanopore Sequencing (DDNS).

The protocol aims to amplify the VP1 region of poliovirus through a semi-nested PCR using a pan-Enterovirus primer and polio specific primers followed by amplification of the VP1 region using a polio specific primer set. We use barcoded primers as this greatly simplifies the subsequent library preparation process. Within the protocol steps quality control checks are included. Following the QC steps as you go ensures the validity of your results and provides easier troubleshooting when needed.

This protocol is for use with Oxford Nanopore v14 chemistry ligation sequencing reagents and can be used with the MinION Mk1B, MinION Mk1D, or GridION sequencer.

## Guidelines

Les étapes 13 et suivantes sont basées sur le protocole de séquençage par ligation d'amplicons d'Oxford Nanopore Technologies.

Si vous disposez d'un TapeStation ou d'un système similaire dans votre laboratoire, vous pouvez l'utiliser à la place des gels pour les étapes de contrôle de qualité.



## Materials



Equipment\_Reagents\_for\_DDNS.xlsx 12.8KB

✕ SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq **Invitrogen - Thermo Fisher Catalog #12574026**

✕ DreamTaq PCR Master Mix (2X) **Thermo Fisher Catalog #K1071**

✕ NEBNext Ultra II End Repair/dA-Tailing Module - 24 rxns **New England Biolabs Catalog #E7546S**

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

✕ Ligation Sequencing Kit V14 **Oxford Nanopore Technologies Catalog #SQK-LSK114**

✕ Ethanol, Absolute, Molecular Biology Grade **Thermo Fisher Scientific Catalog #BP2818500**

### 0.2 ml PCR tubes

✕ 1.5 mL LoBind tubes **Eppendorf Catalog #022431021**

✕ UltraPure DNase/RNase-Free Distilled Water **Thermo Fisher Scientific Catalog #10977023**

✕ UltraPure BSA (50 mg/mL) **Thermo Fisher Scientific Catalog #AM2616**

✕ Agencourt AMPure XP **Beckman Coulter Catalog #A63880**

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

✕ ONT Flow Cell Wash Kit **Oxford Nanopore Technologies Catalog #EXP-WSH004**



## Protocol materials

- ✕ Agencourt AMPure XP magnetic beads **Beckman Coulter Catalog #A63880**
- ✕ SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq **Invitrogen - Thermo Fisher Catalog #12574026**
- ✕ DreamTaq PCR Master Mix (2X) **Thermo Fisher Catalog #K1071**
- ✕ NEBNext Ultra II End Repair/dA-Tailing Module - 24 rxns **New England Biolabs Catalog #E7546S**
- ✕ NEBNext Quick Ligation Module - 20 rxns **New England Biolabs Catalog #E6056S**
- ✕ Ligation Sequencing Kit V14 **Oxford Nanopore Technologies Catalog #SQK-LSK114**
- ✕ ONT Flow Cell Wash Kit **Oxford Nanopore Technologies Catalog #EXP-WSH004**
- ✕ Agencourt AMPure XP **Beckman Coulter Catalog #A63880**
- ✕ Nanopore Flow Cell R10.4.1 **Oxford Nanopore Technologies Catalog #FLO-MIN114**
- ✕ Ethanol, Absolute, Molecular Biology Grade **Thermo Fisher Scientific Catalog #BP2818500**
- ✕ Ligation Sequencing Kit V14 **Oxford Nanopore Technologies Catalog #SQK-LSK114**
- ✕ 1.5 mL LoBind tubes **Eppendorf Catalog #022431021**
- ✕ UltraPure DNase/RNase-Free Distilled Water **Thermo Fisher Scientific Catalog #10977023**
- ✕ UltraPure BSA (50 mg/mL) **Thermo Fisher Scientific Catalog #AM2616**

## Before start

### Avant de commencer

#### Extraction d'ARN

Ce protocole décrit l'amplification de la région VP1, le codage-barres des échantillons, et la préparation de la bibliothèque. Nous supposons que les utilisateurs auront préalablement effectué une extraction d'ARN pour extraire l'ARN du poliovirus. Nous recommandons le kit "MagMAX Viral RNA Isolation", utilisé manuellement ou sur KingFisher Duo ou Flex.

#### Amorces VP1 à code-barres :

Afin de simplifier le protocole, nous utilisons une plaque d'amorces de 96 puits contenant 5  $\mu$ M d'amorces Y7 à code-barres et 5  $\mu$ M d'amorces Q8 à code-barres dans chaque puits, pour une concentration totale d'amorces de 10  $\mu$ M.

Chaque puit contient les amorces Q8 et Y7 portant le même code-barres unique, par exemple : A1 = Y7 avec code-barres 1 et Q8 avec code-barres 1, A2 = Y7 avec code-barres 2 et Q8 avec code-barres 2, etc.

L'ensemble complet des 96 séquences d'amorces avec code-barres est présenté dans le Dataset\_S1 de Shaw et al. (2020) and dans la feuille de calcul ci-jointe.



BarcodedPrimers.xlsx 20KB

#### Nettoyage du laboratoire

Avant de commencer le processus, il est essentiel de décontaminer toutes les surfaces et tous les équipements, comme les pipettes, afin d'éviter toute contamination de vos réactions PCR ou de votre bibliothèque de séquençage.

Pour décontaminer l'emplacement où vous préparez la RT-PCR, vous pouvez utiliser un agent nettoyant spécifique, tel que RNase Zap (AM9782, Invitrogen), en association avec de l'éthanol à 70 %.

Lors de la mise en place du PCR nichée et de la bibliothèque de séquençage, vous pouvez essuyer les surfaces et les pipettes avec un agent nettoyant spécifique à l'ADN, tel que DNA Zap (AM9890, Invitrogen), et de l'éthanol à 70 %.

## Organisation des échantillons

30m

- 1 Des paires d'échantillons (ayant le même EPID) peuvent avoir des codes-barres consécutifs. Veuillez toutefois à ne pas regrouper les échantillons provenant d'une même zone géographique. Cela permet de détecter toute contamination croisée potentielle, car il est alors peu probable que des séquences identiques soient détectées dans des échantillons portant des codes-barres consécutifs et adjacents sur la plaque 96 puits.
- 1.1 Enregistrez les données et l'ordre des échantillons dans un fichier CSV. Vous pouvez également ajouter d'autres métadonnées, telles que l'EPID, le pays d'origine, la date de prélèvement et de réception de l'échantillon, et la date d'extraction de l'ARN.

30m

Voici un exemple du fichier CSV:



`samples_csv_template_v2.csv` 661B

Il est conseillé de modifier le nom du fichier afin qu'il soit unique pour chaque analyse. Si vous modifiez des en-têtes de colonne dans le fichier CSV, n'utilisez pas d'espaces ni de caractères spéciaux.

Vous devez également inclure les contrôles positifs et négatifs dans votre liste d'échantillons. Un contrôle positif (Coxsackievirus A20 remis en suspension fourni par la MHRA) et un contrôle négatif (de l'eau sans nucléase) doivent être inclus dans les premiers et derniers lots d'extraction d'ARN de la journée, au moins. Pour être traité par PIRANHA, le contrôle positif doit simplement être indiqué « positive » et le négatif « negative » dans la colonne échantillon (sample). S'il y a plusieurs contrôles positifs ou négatifs, vous pouvez les définir en ajoutant un trait de soulignement et un numéro.

Si des échantillons sont des répétitions d'une analyse précédente, notez-le dans la colonne « IsQCRetest » et le numéro de l'analyse d'origine dans la colonne « IfRetestOriginalRun ».

### Note

**Remarque :** N'incluez aucune information personnelle des patients dans votre fichier CSV et évitez d'utiliser des caractères spéciaux dans les colonnes de métadonnées, y compris les noms des échantillons (respecter - ou \_).

## PCR de premier tour (semi-nichée)

4h 30m

- 2 Nettoyer les surfaces de laboratoire et les pipettes avec un agent nettoyant spécifique de l'ARNase, tel que RNase Zap, et de l'éthanol à 70 %.
- 3 Préparer un mélange réactionnel en utilisant les volumes de réaction détaillés dans le tableau ci-dessous pour le nombre d'échantillons et les contrôles négatifs. Le mélange réactionnel et l'enzyme SSIII sont fournis dans

20m



SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq **Invitrogen - Thermo Fisher Catalog #12574026**

Amorce sens : Y7 [GGGTTTTGTGTCAGCCTGTAATGA]

Amorces antisens : Cre [TCAATACGGTGTTTGCTCTTGAAGT] (Arita et al. 2015)  
nOPV-MM-R [TCGATACGGTGCTTGGATTAAATTG]

#### Note

Les amorces antisens comprennent une amorce pan-entérovirus et une amorce permettant l'amplification du nOPV2. **Elles sont mélangées pour obtenir une solution contenant chaque amorce à 10  $\mu$ M.**

Par exemple, 10  $\mu$ L de chaque stock d'amorces antisens à 100  $\mu$ M sont ajoutés à 80  $\mu$ L d'eau sans nucléase pour obtenir 100  $\mu$ L de solution de travail contenant chaque amorce à 10  $\mu$ M.

| Réactif                    | 1 réaction (uL) |
|----------------------------|-----------------|
| 2x mélange réactionnel     | 12.5            |
| Mélange SSIII Platinum Taq | 1               |
| Amorces antisens           | 1               |
| L'eau sans nucléase        | 4.5             |

Tableau 1 : Contenu du master mix pour une première réaction PCR. Ce nombre peut être multiplié pour correspondre au nombre de réactions à réaliser.



4 Vortexer le master mix pendant 3 secondes, puis centrifuger pendant 5 secondes pour recueillir le contenu au fond du tube. Aliquoter 19  $\mu\text{L}$  dans chaque tube PCR et ajouter 5  $\mu\text{L}$  d'ARN échantillon ou d'eau sans nucléases pour les contrôles négatifs.

10m

5 Incuber dans un thermocycleur pendant 30 minutes à 50°C.

30m

6 Ajouter 1  $\mu\text{L}$  d'amorce sens à chaque réaction.

5m

7 Amplifier en utilisant les conditions de cyclage suivantes:

3h 20m

|  | A     | B                     | C                | D                     |
|--|-------|-----------------------|------------------|-----------------------|
|  | Cycle | Étape                 | Température (°C) | Temps                 |
|  | 1     | Dénaturation initiale | 94               | 2 minutes             |
|  | 42    | Dénaturation          | 94               | 15 secondes           |
|  |       | Recuit                | 55               | 30 secondes           |
|  |       | Extension             | 68               | 2 minutes 30 secondes |
|  | 1     | Extension finale      | 68               | 5 minutes             |
|  | -     | Maintenir             | 10               | -                     |

Tableau 2: Conditions de cyclage pour le PCR de premier tour

#### Note

**À noter:** La méthode DDNS a été validée sur les thermocycleurs Eppendorf Nexus et Applied Biosystems ProFlex. Les thermocycleurs d'autres modèles et fabricants pourraient nécessiter des ajustements de leurs paramètres, notamment de la vitesse de montée en température, pour obtenir une amplification suffisante.

- 7.1 Une fois la PCR est terminée, vérifiez si des réactions se sont évaporées. Si c'est le cas, notez-le dans l'échantillon CSV.

5m

Notez dans votre CSV la date de la première PCR.

## PCR de deuxième tour (amplification VP1)

5h 10m 10s

- 8 Essuyez toutes les surfaces de laboratoire et les pipettes avec un agent nettoyant spécifique à l'ADN, tel que DNA Zap, et de l'éthanol à 70 %.

## PCR de deuxième tour (amplification VP1)

5h 10m 10s

- 9 Tableau 3: L'amplification VP1 est réalisée à l'aide d'amorces à code-barres, comme décrit dans le Dataset\_S1 de Shaw *et al.* 2020. Celles-ci doivent être commandées en plaques à 96 puits et les amorces sens et antisens prémélangées pour obtenir un stock de 10  $\mu$ M.

30m

Préparer un mastermix comme décrit ci-dessous en utilisant

 DreamTaq PCR Master Mix (2X) **Thermo Fisher Catalog #K1071** et en multipliant le nombre de réactions requises :

- 10 Vortexer le mastermix pendant 3 secondes, puis centrifuger pendant 5 secondes pour recueillir le contenu au fond du tube.

10s

- 11 Aliquoter 21  $\mu$ L pour chaque puit d'une plaque PCR à 96 puits et ajouter 2  $\mu$ L d'amorces à code-barres 10  $\mu$ M (y compris 5  $\mu$ M d'amorce sens et 5  $\mu$ M d'amorce antisens avec le même code-barres - déjà mélangés), en veillant à utiliser un code-barre différent pour chaque échantillon. Ajoute 2  $\mu$ L de produit de PCR de premier cycle ou d'eau sans nucléase pour les contrôles négatifs de PCR.

10m

- 12 Amplifier en utilisant les conditions de cyclage suivantes :

2h

|  | A     | B     | C           | D     |
|--|-------|-------|-------------|-------|
|  | Cycle | Étape | Température | Temps |

|  | A  | B                     | C  | D           |
|--|----|-----------------------|----|-------------|
|  | 1  | Dénaturation initiale | 95 | 2 minutes   |
|  | 42 | Dénaturation          | 95 | 30 secondes |
|  |    | Recuit                | 55 | 30 seconds  |
|  |    | Extension             | 72 | 1 minute    |
|  | 1  | Extension finale      | 72 | 10 minutes  |
|  | -  | Maintenir             | 10 | -           |

Tableau 4: Conditions de cyclage pour la PCR VP1

- 13 Une fois la PCR terminée, vérifiez si des réactions se sont évaporées. Si c'est le cas, notez-le dans le fichier CSV de l'échantillon.

Saisissez dans votre fichier CSV la date de réalisation de la PCR VP1.

- 14 Vérifiez tous les contrôles positifs et négatifs de la réaction VP1 sur un gel d'agarose à 1 %. La bande attendue pour le contrôle positif est d'environ 1.2 kb.

1h

Tous les échantillons peuvent être marqués « Réussi » pour la vérification du contrôle positif dans le fichier CSV de codes-barres si **tous les contrôles positifs** extraits le même jour présentent une bande VP1 sur le gel.

Tous les échantillons peuvent être marqués « Réussi » pour la vérification du contrôle négatif si tous les contrôles négatifs extraits le même jour ne présentent aucune bande VP1 sur le gel.

Si des contrôles positifs échouent, ou si des contrôles négatifs présentent une bande, tous les échantillons extraits le même jour doivent être marqués comme échoués.

- 14.1 Si le contrôle positif échoue, effectuez le produit du contrôle positif du premier PCR sur un gel à 1 %.

1h

En l'absence de bande, répéter la réaction VP1 **pour le contrôle**.

Si le contrôle positif présente une bande, éliminer les amplicons VP1 et répéter les réactions VP1 **pour tous les échantillons**.

Si aucune bande n'est visible après la répétition de la réaction VP1, répéter les extractions d'ARN après avoir vérifié que le kit d'extraction d'ARN est utilisé correctement et n'est pas périmé.



- 14.2 Si la vérification du contrôle négatif échoue, répéter la PCR du premier tour et la VP1 nichée.

30m

Si le contrôle négatif présente toujours une bande sur une station de gel ou de bande :

1. Nettoyer soigneusement les stations de PCR et d'extraction d'ARN.
2. Remplacer tour à tour les réactifs du premier tour et VP1 en effectuant des réactions à blanc afin de détecter un réactif contaminé.
3. Réaliser une extraction d'ARN négatif supplémentaire pour confirmer que le kit d'extraction d'ARN n'est pas contaminé.

#### Note

Pour éviter toute contamination due à des surfaces/équipements de laboratoire contaminés, nous recommandons de nettoyer en profondeur les postes de travail PCR et ARN toutes les 5 analyses.

## Préparation de la Bibliothèque pour ONT MinION : Pooling, Préparation des Extrémités et Ligature de L'adaptateur

1h 46m 30s

- 15 Réunir 2 µL de chaque produit PCR VP1 dans un tube de 1,5 mL et concentrer avec des billes AMPure.

5m

 Agencourt AMPure XP magnetic beads **Beckman Coulter Catalog #A63880**

- 15.1 Ajouter un volume de billes AMPure égal au volume des produits VP1 mis en pool et incubé à température ambiante pendant 5 minutes. Agiter légèrement après 2 minutes pour faciliter la liaison.

6m

Exemple : 50 échantillons, 2 µl de chaque pool = 100 µl de pool ; ajouter 100 µl de billes AMPure.

- 15.2 Centrifuger le tube pendant 3 secondes, puis placer le sur un support magnétique jusqu'à ce que toutes les billes forment un culot et que la solution soit claire.

3m

- 15.3 Pipetter la solution en évitant de perturber le culot de billes.

1m

15.4 Ajouter 200 µl d'éthanol à 80 % dans le tube, laisser agir 30 secondes, puis le retirer et le jeter.

2m

Répéter.

15.5 Centrifuger le tube pendant 2 secondes, le replacer sur l'aimant, puis éliminer l'éthanol restant.

1m

Laisser le culot sécher à l'air libre pendant 30 secondes ou jusqu'à ce qu'il soit sec mais non fissuré.

15.6 Retirer le tube de l'aimant et ajouter 51 µl d'eau sans nucléase. Tapoter le tube pour remettre les billes en suspension et incubé à température ambiante pendant 2 minutes.

3m

15.7 Centrifuger le tube pendant 3 secondes, puis le replacer sur l'aimant, en laissant les billes se sédimenter complètement.

30s

15.8 Prélever 50 µl d'ADN élué et ajouter-le à un tube PCR propre de 0,2 ml.

30s

16 Préparation finale : Ajouter les réactifs suivants de

2m



NEBNext Ultra II End Repair/dA-Tailing Module - 24 rxns **New England**  
**Biolabs Catalog #E7546S**

au tube de 0,2 ml contenant le pool d'ADN nettoyé.

| A                                                | B      |
|--------------------------------------------------|--------|
| Réactif                                          | Volume |
| Tampon de reaction Ultra II End-prep             | 7      |
| Melange d'enzymes de preparation finale Ultra II | 3      |

Tableau 5: Réaction pour la préparation finale de votre bibliothèque regroupée

17 Mélanger doucement en tapotant le tube et en tournant pendant 3 secondes

1m

18 Dans le thermocycleur, incubé 5 minutes à 20 °C, puis 5 minutes à 65 °C.

10m



- 19 Transférer dans un tube de 1,5 ml et effectuer un nettoyage des billes AMPure. 15m
- 19.1 Mélanger les billes AMPure au vortex jusqu'à homogénéité. 30s
- 19.2 Ajouter 60 µl de billes remises en suspension dans le tube et agiter légèrement le tube pour mélanger. 5m
- Incuber à température ambiante pendant 5 minutes. Agiter légèrement après 2 minutes pour faciliter la liaison.
- 19.3 Centrifuger le tube pendant 3 secondes, puis le placer sur un support magnétique jusqu'à ce que toutes les billes forment un culot et que la solution soit claire. 1m
- 19.4 Pipetter la solution en évitant de perturber le culot de billes. 1m
- 19.5 Ajouter 200 µl d'éthanol à 80 % au tube, laisser reposer 30 secondes, puis retirer et jeter. 2m
- Répéter.
- 19.6 Centrifuger le tube pendant 2 secondes, replacer-le sur l'aimant, puis éliminer l'éthanol restant. 2m
- Laisser le culot sécher à l'air pendant 1 minute ou jusqu'à ce qu'il soit sec mais non fissuré.
- 19.7 Retirer le tube de l'aimant et ajouter 61 µl d'eau sans nucléase. Tapoter pour remettre les billes en suspension et incuber à température ambiante pendant 2 minutes. 3m
- 19.8 Centrifuger le tube pendant 3 secondes, puis replacer-le sur l'aimant, afin de permettre aux billes de se sédimenter complètement. 1m
- 19.9 Prélever 60 µl d'ADN élué et le verser dans un tube propre de 1,5 ml. 30s

## Note

À ce étape, vous pouvez conserver la librairie préparée à 4°C. Elle peut être conservée jusqu'à une semaine avant de passer à l'étape 20. Il est toutefois conseillé de poursuivre le protocole de préparation de la librairie dès que possible.

Veillez à étiqueter clairement le tube avec le nom de la série et l'état d'avancement de la préparation de la librairie, par exemple : 20240229 DDNSrun10 end-prep.

20 De

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

: Centrifuger la ligase NEB Quick T4 et la placer sur de la glace .

De

 Ligation Sequencing Kit V14 **Oxford Nanopore Technologies Catalog #SQK-LSK114**

:

Centrifuger et décongeler l'adaptateur de ligature (LA) sur de la glace.

Décongeler le tampon de ligature (LNB)

à température ambiante, centrifuger, mélanger par pipetage, puis placer sur de la glace.

Décongeler le tampon d'élution (EB) et le tampon de fragments courts (SFB)

à température ambiante, mélanger par vortex, puis placer sur de la glace.

Si vous prévoyez de démarrer le séquençage le même jour, retirez le tampon de rinçage, le câble de rinçage (FLT) et la BSA du congélateur et décongelez-les à température ambiante. Une fois décongelé, placez-le sur de la glace.

Sortir la flow cell (FLO-MIN114, R10.4.1) du réfrigérateur pour la laisser revenir à température ambiante.

21 Préparer le mélange réactionnel suivant en ajoutant les réactifs au tube de 1,5 ml contenant l'ADN préparé :

| A                                | B           |
|----------------------------------|-------------|
| Réactif                          | Volume (uL) |
| ADN préparé                      | 60          |
| Tampon de ligature (LNB)         | 25          |
| NEBNext Rapide T4 ADN (Quick T4) | 10          |

3m

2m

| A                           | B |
|-----------------------------|---|
| Adaptateur de ligature (LA) | 5 |

Tableau 6: Mélange réactionnel pour la ligature de l'adaptateur de séquençage

22 Mélanger délicatement en tapotant le tube, puis centrifuger.

1m

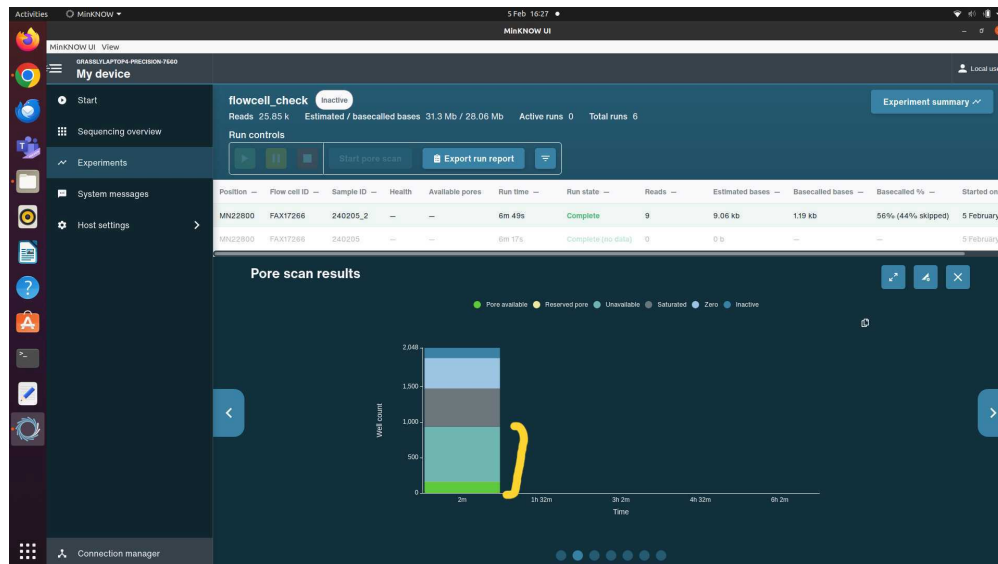
23 Incuber à température ambiante pendant 10 minutes.

10m

23.1 Pendant ce temps, vous pouvez effectuer la vérification de flow cell.

Branchez votre appareil de séquençage, ouvrez le couvercle et insérez votre flow cell. Dans le logiciel MinKNOW, accédez au panneau de démarrage, sélectionnez « Vérification de la flow cell » ("Flowcell Check"), puis « Démarrer » ("start"). Cela vous indiquera le nombre de pores disponibles pour le séquençage.

Si votre flow cell a déjà été utilisée, au lieu d'effectuer une vérification, lancez une série de séquençage fictif en sélectionnant « Démarrer le séquençage » ("Start sequencing"), nommez la série « flowcell\_check », sélectionnez n'importe quel kit, réglez la durée sur 0,2 heures, puis démarrez l'analyse. Au début de l'exécution, il effectuera une courte vérification de la flow cell et donnera un nombre plus précis pour les pores disponibles (calculé en additionnant les pores disponibles et indisponibles dans le graphique d'état des pores (voir l'exemple ci-dessous)).



Si une flow cell comporte moins de 700 pores, ne l'utilisez pas pour une analyse DDNS de 96 échantillons. Utilisez une autre flow cell et effectuez une vérification.

Le nombre de pores disponibles dans la flow cell utilisée pour le séquençage doit être indiqué dans le fichier CSV d'échantillon, dans la colonne « PoresAvailableAtFlowCellCheck », et l'identifiant de la flow cell doit être enregistré dans la colonne « FlowCellID ». Notez également le nombre de fois où la flow cell a été utilisée précédemment dans la colonne « FlowCellUses ».

- 24 Effectuez une purification par billes AMPure en utilisant 40 µl de billes AMPure XP remises en suspension.

Remarque : Ce nettoyage est différent du précédent car il utilise le tampon de fragments courts (SFB) et le tampon d'éluion (EB) ONT au lieu d'éthanol à 80% et d'eau.

- 24.1 Vortexer les billes AMPure jusqu'à ce qu'elles soient bien mélangées.

30s

- 24.2 Ajouter 40 µl de billes remises en suspension dans le tube de 1,5 ml et mélanger en agitant légèrement le tube.

6m

Incuber à température ambiante pendant 5 minutes. Agiter doucement après 2 minutes pour faciliter la liaison.

- 24.3 Centrifuger le tube pendant 3 secondes, puis le placer sur un support magnétique jusqu'à ce que toutes les billes forment un culot et que la solution soit claire.

1m



- 24.4 Pipetter la solution en évitant de perturber le culot de billes. 30s
- 24.5 Ajouter 250 µl de tampon pour fragments courts (SFB). Retirer le tube de l'aimant et remettre les billes en suspension dans le SFB en tapotant légèrement le tube. Centrifuger pendant 3 secondes, puis replacer le tube sur l'aimant. Laisser les billes se sédimenter, puis les retirer et les jeter. Répéter l'opération. 4m
- 24.6 Centrifuger le tube pendant 2 secondes, replacer-le sur l'aimant, puis retirer le SFB restant. 1m
- Laisser le culot sécher à l'air libre pendant 1 minute ou jusqu'à ce qu'il soit sec mais non fissuré.
- 24.7 Retirer le tube de l'aimant et ajouter 15 µl de tampon d'élution (EB). Tapoter légèrement pour remettre les billes en suspension et incuber à température ambiante pendant 10 minutes. 10m
- 24.8 Centrifuger le tube pendant 3 secondes, puis le replacer sur l'aimant, pour laisser les billes se sédimenter complètement. 1m
- 24.9 Prélever 12 µl d'ADN élué et transférer-le dans un tube propre de 1,5 ml. 30s

#### Note

À noter:

À cette étape, vous pouvez conserver votre bibliothèque préparée à 4°C toute la nuit avec une perte de débit minimale. Elle peut être conservée jusqu'à deux semaines avant le séquençage. Cependant, nous vous recommandons de poursuivre le chargement des Flow Cells dès que possible.

Veillez à étiqueter clairement le tube avec le nom de la série et l'état d'avancement de la préparation de la bibliothèque, par exemple : 20240229 DDNSrun10 bibliothèque finale.

## Amorçage et chargement de la flow cell MinION

29m 30s

- 25 Décongeler le tampon de séquençage (SB), les billes de la bibliothèque (LIB), le Flow Cell Tether (FCT) et un tube de Flow Cell Flush (FCF) à température ambiante, puis placer sur la glace. 10m



Mélanger le SQB, le FCF et le FCT au vortex, centrifuger et remettre sur la glace.  
Centrifuger la LIB, puis la remettre sur la glace.

- 26 Pour préparer l'amorçage, mélanger les réactifs suivants dans un tube propre de 1,5 ml :

2m

| A                      | B      |
|------------------------|--------|
| Réactif                | Volume |
| Flow Cell Flush (FCF)  | 1170   |
| Flow Cell Tether (FCT) | 30     |
| BSA (50 mg/ml)         | 5      |

Mélanger par pipetage et centrifuger. Placer sur glace jusqu'à utilisation.

- 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 de le rendre visible. Après ouverture du port d'amorçage, vérifiez l'absence de bulles sous le couvercle. Prélevez un petit volume pour éliminer les bulles (quelques  $\mu\text{L}$ ). Vérifiez visuellement la continuité du tampon entre le port d'amorçage et le réseau de capteurs.

3m

- 28 À l'aide d'une pipette P1000, chargez lentement 800  $\mu\text{L}$  de mélange d'amorçage dans la flow cell par le port d'amorçage.

2m

Laissez une petite quantité de liquide à l'extrémité de la pipette pour éviter l'introduction d'air dans le flow cell.

Laissez pendant 5 minutes.

- 29 Mélangez le contenu du tube LIB en pipetant juste avant de l'ajouter au mélange de bibliothèque suivant dans un tube de 1,5 ml :

2m

| A                      | B                        |
|------------------------|--------------------------|
| Réactif                | Volume ( $\mu\text{L}$ ) |
| Bibliothèque de l'ADN  | 12                       |
| Sequencing buffer (SB) | 37.5                     |
| Library beads (LIB)    | 25.5                     |



30 Terminez l'amorçage du flow cell en ouvrant le couvercle du port SpotOn et en y insérant délicatement 200 µl de mélange d'amorçage dans **le port d'amorçage**. Comme précédemment, laissez une petite quantité de liquide au fond de la pointe pour éviter la formation de bulles d'air.

2m

Lors de l'ajout du mélange d'amorçage, vous pourriez observer une légère remontée de liquide par le port SpotOn. Si c'est le cas, prenez une pause et laissez le liquide refluer dans le flow cell avant de continuer l'ajout du mélange d'amorçage.

31 Mélangez délicatement le mélange de bibliothèque préparé par pipetage.

2m

Ajoutez le mélange de bibliothèque à la flow cell via le port SpotOn, goutte à goutte, en laissant chaque goutte s'écouler dans le flow cell avant d'ajouter la suivante.

32 Remettez le couvercle du port SpotOn en place et fermez le port d'amorçage, puis remettez le couvercle de votre dispositif de séquençage en place.

1m

33 Dans le logiciel MinKNOW, suivez les étapes ci-dessous pour configurer et démarrer votre séquençage.

30s

33.1 Cliquez sur « Démarrer » ("Start"), puis sur « Démarrer le séquençage » ("Start sequencing").

1m

Créez un nom pour votre séquençage. Il est recommandé de le rendre unique et identifiable en cas de besoin de réexaminer les données. Il est recommandé d'indiquer la date et le nom de l'expérience. Dans le nom de l'échantillon, vous pouvez indiquer un numéro ou répéter le nom de l'expérience ; ce n'est pas aussi important que le nom de l'exécution. Cliquez ensuite sur « Continuer » ("Continue").

33.2 Sélectionnez le kit utilisé : SQK-LSK114. Après avoir cliqué dessus, les options de code-barres s'afficheront. Sélectionnez EXP-PBC096, puis cliquez sur « Continuer » ("Continue").

30s

33.3 Dans les options de durée d'exécution, définissez la durée d'exécution sur 4 heures pour une exécution DDNS prospective.

30s

33.4 Dans les options de basecalling, sélectionnez « High accuracy basecalling ». Dans les options de code-barres, assurez-vous que le code-barres est activé et activez l'utilisation du code-barres aux deux extrémités. Vérifiez les options sélectionnées, puis cliquez sur « Start run ».

1m

33.5 Dans votre exemple de fichier CSV, enregistrez le numéro d'exécution dans la colonne « RunNumber », la date dans « DateSeqRunLoaded » et la durée d'exécution dans « RunHoursDuration ».

2m

## Lavage de votre Flow Cell

1h 23m

- 34 Une fois le séquençage terminé, vous pouvez laver votre Flow Cell pour éliminer la bibliothèque restante et la préparer pour un autre séquençage ou pour le stockage à

4 °C .

Le lavage utilise les réactifs fournis dans le kit de lavage ONT :

ONT Flow Cell Wash Kit **Oxford Nanopore Technologies Catalog #EXP-WSH004**

- 34.1 Décongeler le diluant de lavage à température ambiante et mélanger brièvement au vortex.

10m

Centrifuger le tube de mélange de lavage (WMX) et le placer sur de la glace.

- 34.2 Préparer la solution de lavage suivante dans un tube propre de 1,5 ml.

5m

|  | A              | B      |
|--|----------------|--------|
|  | Réactif        | Volume |
|  | Wash diluent   | 398 µL |
|  | Wash Mix (WMX) | 2 µL   |

- 35 Ouvrez le port d'amorçage et, à l'aide d'une pipette P1000, prélevez délicatement une petite quantité de liquide afin d'éliminer les bulles d'air sous le port.

2m

- 36 Ajoutez délicatement 200 µL de solution de lavage par le port d'amorçage, en laissant une petite quantité de liquide dans l'embout vers l'extrémité pour éviter l'introduction de bulles d'air. Fermez le port d'amorçage et laissez incuber 5 minutes à température ambiante.

1m

- 36.1 Ajoutez les 200 µL restants de solution de lavage par le port d'amorçage. Fermez le port d'amorçage et laissez incuber à température ambiante pendant une heure.

1h

Vous pouvez alors retirer tous les déchets du canal d'évacuation, en vous assurant que le port d'amorçage est fermé avant retirer les déchets.

Vous pouvez également apposer une étiquette sur l'emballage de la flow cell précisant la date, le contenu et la durée de l'analyse, par exemple. 13/03/2024 DDNS-run30 4 heures.



Si vous prévoyez de stocker le flow cell pour une réutilisation ultérieure, retirez le flacon de tampon de stockage du kit de lavage et décongelez-le à température ambiante.

- 36.2 Après l'incubation, vous pouvez suivre les étapes d'amorçage et de chargement de la flow cell à partir de l'étape 20 pour charger une nouvelle série, ou suivre les étapes suivantes pour stocker la flow cell pour une utilisation ultérieure.

5m

Vortexez brièvement le tampon de stockage décongelé pour mélanger, puis ajoutez lentement 500 µl par le port d'amorçage.

Fermez le port d'amorçage avant de retirer tous les déchets du canal d'évacuation. Remettez la flow cell dans sa boîte en plastique et son enveloppe, puis conservez-la à 4 °C.

## Acknowledgements

Gates Foundation