

Apr 06, 2024

Séquençage nanopore d'isolats de poliovirus

DOI

<https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.4r3l2qmppl1y/v1>

Catherine Troman¹, Erika Bujaki², Joyce Akello¹, Shannon Fitz¹, Alex Shaw¹, Javier Martin², Nick Grassly¹

¹Imperial College London; ²MHRA

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.4r3l2qmppl1y/v1>

Protocol Citation: Catherine Troman, Erika Bujaki, Joyce Akello, Shannon Fitz, Alex Shaw, Javier Martin, Nick Grassly 2024. Séquençage nanopore d'isolats de poliovirus. **protocols.io** <https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.4r3l2qmppl1y/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: March 22, 2024

Last Modified: April 06, 2024

Protocol Integer ID: 97143

Keywords: détection directe du poliovirus par séquençage nanopore, du poliovirus, région vp1 du poliovirus, poliovirus, poliovirus abstrait, ce protocole devrait être utilisé avec les réactif, séquençage nanopore, une utilisation avec des isolat, et q8 avec code, magmax viral rna isolation, amorces vp1, barres se trouvent dans le base, ce protocole devrait être utilisé, ce protocole est adapté du protocole, pour permettre un protocole, viral rna, des isolat, ce protocole, le protocole, minion mk1c, barres et

Funders Acknowledgements:

Bill and Melinda Gates Foundation

Abstract

ABSTRAIT

Ce protocole est adapté du protocole "Détection directe du poliovirus par séquençage nanopore - les échantillons de selles" pour le rendre adapté à une utilisation avec des isolats sous forme liquide ou qui ont été transportés au laboratoire via une carte FTA.

Le protocole vise à amplifier la région VP1 du poliovirus avec une seule PCR à l'aide de amorces Q8/Y7. Nous utilisons des amorces à code-barres car cela simplifie grandement le processus ultérieur de préparation de la bibliothèque. Les séquences d'amorces pour les amorces Q8/Y7 à code-barres se trouvent dans le base de données S1 de Shaw et al (2020).

Ce protocole devrait être utilisé avec les réactifs de séquençage chimique Oxford Nanopore kit14 et le séquenceur MinION Mk1B, MinION Mk1C ou GridION.

Dans les étapes du protocole, des contrôles de qualité sont inclus et suivent le flux de travail défini dans le document « Quality Control and Data Recording for DDNS ».

AVANT DE COMMENCER

Ce protocole décrit l'amplification de la séquence VP1 et la préparation de la bibliothèque pour le séquençage. Nous prévoyons que les utilisateurs auront effectué une extraction d'ARN avant ce protocole pour extraire l'ARN du poliovirus. Nous recommandons le kit "MagMAX Viral RNA Isolation" pour ce processus.

Amorces VP1 à code-barres:

Pour permettre un protocole simplifié, nous utilisons une plaque d'amorce à 96 puits avec 5 μ M d'amorce Y7 à code-barres et 5 μ M d'amorce Q8 à code-barres dans chaque puit. Chaque puit contient des amorces Q8 et Y7 avec 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.

Ces amorces peuvent être commandées prémélangées ou sous forme de deux plaques distinctes qui doit être mélangées au laboratoire.



Protocol materials

⊗ Agencourt AMPure beads **Beckman Coulter**

⊗ SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq **Invitrogen - Thermo**
Fisher Catalog #12457-026

⊗ NEBNext Ultra End Repair/dA-Tailing Module - 96 rxns **New England Biolabs Catalog #E7442L**

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

⊗ Oxford Nanopore Ligation Sequencing Kit **Oxford Nanopore Technologies Catalog #SQK-LSK110**

⊗ Ultrapure BSA **Ambion Catalog #AM2616**

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

Organisation des échantillons

- 1 Les paires d'échantillons (avec le même EPID) peuvent avoir des codes-barres consécutifs, mais essayez de ne pas regrouper les échantillons de la 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 comportant des codes-barres consécutifs adjacents les uns aux autres sur la plaque à 96 puits.
- 1.1 Enregistrez les données d'échantillon et l'ordre des échantillons dans votre fichier csv. À cette étape, vous pouvez également ajouter toute autre métadonnée dont vous disposez pour les échantillons.

Voici un exemple de fichier csv de code-barres :  barcodes.csv 849B

Il est conseillé de modifier le nom du fichier afin qu'il soit unique pour chaque exécution que vous analysez.

Vous devez également inclure tous les contrôles positifs et négatifs dans votre liste d'échantillons. Un contrôle positif (Coxsackievirus A20 remis en suspension fourni par NIBSC) et un contrôle négatif (de l'eau sans nucléase) doivent chacun être inclus dans le premier et le dernier lots d'extraction d'ARN de la journée au moins.

Si des échantillons sont des répétitions d'une analyse précédente, notez-le dans la colonne appropriée.

S'il y a eu un retard dans le traitement de l'échantillon, par exemple en raison d'un manque de kits d'extraction ou de mises à jour logicielles empêchant l'exécution, notez « Oui » dans la colonne « DelaysInProcessingForDDNS » et saisissez le type de délai dans la colonne « DetailsOfDelays ».

À NOTER

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 (tenez-vous-en à - ou _).

- 2 Pour regrouper des échantillons dans une analyse, nous recommandons d'effectuer une analyse de séquençage au moins une fois toutes les deux semaines avec un maximum de 48 échantillons (y compris les contrôles positifs et négatifs).

Cette fréquence évite de provoquer un délai trop long entre les analyses de séquençage lorsque l'on attend que les numéros d'échantillons s'accumulent pour être regroupés.

rt-PCR (Amplification VP1 à code-barres)

- 3 Préparez un master mix en utilisant les volumes de réaction comme détaillé ci-dessous pour le nombre d'échantillons dont vous disposez plus les contrôles négatifs. Le mélange réactionnel et l'enzyme SSIII sont fournis dans:



SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq **Invitrogen - Thermo Fisher Catalog #12457-026**

	A	B
	Réactif	1 réaction (uL)
	2x mélange réactionnel	12.5
	L'eau sans nuclease	4.5
	Mélange SSIII Platinum Taq	1

- 4 Agiter au vortex pendant 3 secondes et centrifuger le master mix pendant 5 secondes. Transférer une partie aliquote de 18 µL dans chaque tube PCR.

Ajouter 2 µL d'amorces VP1 sens et antisens prémélangées, en veillant à utiliser un code-barres différent pour chaque puit.

Ajouter 5 µL de votre échantillon d'ARN a chaque réaction, et 5 µL de l'eau sans nucléase pour les contrôles négatifs, et pipeter 5 fois pour mélanger.

- 5 Centrifuger pendant 5 secondes pour vous assurer que tous les réactifs se trouvent au fond du tube.

- 6 Amplifiez en utilisant les conditions de cycle suivantes:

	A	B	C	D
	Cycle	Étape	Température	Temps

	A	B	C	D
	1	Transcription inversée	50	30 minutes
	1	Dénaturation initiale	94	2 minutes
	42	Dénaturation	94	15 secondes
		Recuit	55	30 secondes
		Extension	68	2 minutes
	1	Extension finale	68	5 minutes
	-	Maintenir	10	-

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

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

Tous les échantillons peuvent être marqués comme « Réussite » pour la vérification du contrôle positif si tous les contrôles positifs extraits le même jour présentent une bande VP1 sur le gel.

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

Si des contrôles positifs échouent ou si des contrôles négatifs présentent une bande, tous les échantillons doivent être marqués comme échec.

8.1 S'il n'y a pas de bande, répétez la réaction VP1 pour les contrôles uniquement. Si une bande est visible après la répétition, jetez les amplicons VP1 précédents et répétez les réactions VP1 pour tous les échantillons.

Si aucune bande n'est visible après avoir répété la PCR, répétez les extractions d'ARN après avoir vérifié que le kit d'extraction d'ARN est utilisé correctement et n'est pas périmé.

8.2 Si la vérification du contrôle négatif échoue, répétez la rtPCR.

Si le contrôle négatif montre toujours une bande sur un gel ou une taping station :
1. Nettoyer soigneusement les postes de travail d'extraction PCR et ARN.

2. Remplacez tour à tour chacun des réactifs PCR tout en effectuant des réactions à blanc pour déterminer un réactif contaminé.
3. Effectuez une extraction supplémentaire d'ARN négatif pour confirmer que ce kit d'extraction d'ARN n'est pas contaminé.

Préparation de bibliothèque pour ONT MinION : pooling, préparation d'extrémité, et ligature d'adaptateurs

- 9 Regroupez 2 ul de chaque produit de PCR VP1 dans un tube propre de 1,5 ml et faire un concentration avec les billes AMPure.  Agencourt AMPure beads **Beckman Coulter**
- 9.1 Ajouter un volume de billes AMPure XP remis en suspension égal à celui du pool dans le tube de 1,5 ml.
Incuber pendant 5 minutes à température ambiante. Tapoter doucement après 2 minutes pour faciliter la liaison des billes.

Par exemple: 40 échantillons, 2 uL de chacun = 80 uL dans le pool, alors on ajoute 80 uL des billes AMPure.
- 9.2 Centrifugez pendant 3 secondes et culottez sur un aimant jusqu'à ce que toutes les billes sont granulé et que la solution soit claire.
- 9.3 Gardez le tube sur l'aimant et pipettez le surnageant, en évitant de perturber les billes.
- 9.4 Lavez les billes avec 200 uL d'éthanol à 80 % fraîchement préparé pendant 30 secondes, sans perturber les billes. Retirez l'éthanol à 80 % à l'aide d'une pipette et jetez-le.
Répéter.
- 9.5 Centrifugez pendant 2 secondes et replacez le tube sur l'aimant. Pipeter tout éthanol résiduel.

Laisser les billes sécher à l'air pendant 30 secondes ou jusqu'à ce qu'il soit sec mais sans se fissurer.
- 9.6 Retirer le tube de l'étagère magnétique et remettre les billes en suspension dans 51 ul d'eau sans nucléase. Tapoter pour resuspendre les billes. Incuber pendant 2 minutes à température ambiante.
- 9.7 Centrifuger pendant 3 secondes, puis peler les billes sur l'aimant jusqu'à ce que l'éluat soit clair et incolore.



9.8 Retirez et conservez 50 uL de l'éluat (la bibliothèque) dans un tube PCR propre de 0,2 ml.

10 End-prep

Effectuez la réparation finale en ajoutant les réactifs suivants au tube de 0,2 ml:



NEBNext Ultra End Repair/dA-Tailing Module - 96 rxns **New England**

Biolabs Catalog #E7442L

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

11 Mélangez doucement en tapotant le tube et centrifugez pendant 3 secondes.

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

13 Transférer l'échantillon dans un tube Eppendorf DNA LoBind de 1,5 mL et effectuer un nettoyage des billes d'AMPure.

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

13.2 Ajouter 60 ul de billes AMPure XP remises en suspension à la réaction et mélanger en tapotant le tube.

Incuber pendant 5 minutes à température ambiante. Tapoter doucement après 2 minutes pour faciliter la liaison des billes.

13.3 Centrifuger pendant 3 secondes, puis peler les billes sur l'aimant jusqu'à ce que l'éluat soit clair et incolore.

13.4 Gardez le tube sur l'aimant et pipettez le surnageant, en évitant de perturber les billes.

- 13.5 Gardez sur l'aimant, lavez les billes avec 200 uL d'éthanol à 80 %, laissez le pendant 30 secondes. Retirez l'éthanol à 80 % à l'aide d'une pipette et jetez-le. Répéter.
- 13.6 Centrifugez pendant 2 secondes et remplacez le tube sur l'aimant. Pipeter tout éthanol résiduel.
- Laisser les billes sécher à l'air pendant 30 secondes ou jusqu'à ce qu'il soit sec mais sans se fissurer.
- 13.7 Retirer le tube de l'étagère magnétique et remettre les billes en suspension dans 61 uL d'eau sans nucléase. Tapoter pour resuspendre les billes. Incuber pendant 2 minutes à température ambiante.
- 13.8 Centrifuger pendant 3 secondes, puis peler les billes sur l'aimant jusqu'à ce que l'éluat soit clair et incolore.
- 13.9 Retirez et conservez 60 uL de l'éluat (la bibliothèque) dans un tube PCR propre de 1.5 mL.

A NOTER:

À ce stade, vous pouvez stocker la bibliothèque préparée à 4°C. Celui-ci peut être conservé jusqu'à une semaine avant de passer à l'étape 14, mais il est conseillé de continuer le protocole de préparation de la bibliothèque dès que possible.

Assurez-vous d'étiqueter clairement le tube avec le nom de l'analyse et à quelle étape de la préparation de la bibliothèque vous vous trouviez, par exemple: 20240229 end-prep DDNSrun10

- 14 Faites tourner et décongelez la ligation adaptor (LA) et la ligase T4 rapide (Quick T4 ligase, NEB) sur de la glace.

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

Utilisez le:

 Oxford Nanopore Ligation Sequencing Kit **Oxford Nanopore Technologies Catalog #SQK-LSK110**

Faites tourner et décongelez la ligation adaptor (LA) sur de la glace.

Décongeler le tampon de ligation (Ligation Buffer - LNB) à température ambiante, centrifuger, mélanger par pipetage. Placer sur de la glace. Décongeler le tampon d'éluat (Elution Buffer - EB) et un tube de tampon de fragments courts (Short Fragment Buffer - SFB) à température ambiante, mélanger au vortex, centrifuger. Placer sur de la glace.

Si vous prévoyez de commencer le séquençage le même jour, retirez le Flow Cell Flush (FCF), le Flush Tether (FLT) et le BSA  Ultrapure BSA **Ambion Catalog #AM2616** du congélateur et décongelez-les à température ambiante. Une fois décongelé, placez-le sur la glace.

Retirez votre Flow Cell du réfrigérateur pour lui permettre de revenir à température ambiante.

- 15 Préparez le mélange réactionnel suivant en ajoutant les réactifs au tube de 1,5 ml avec le 60 ul d'ADN:

A	B
Réactif	Volume (uL)
Tampon de ligature (LNB)	25
NEBNext Rapide T4 ADN (Quick T4)	10
Adaptateur de ligature (LA)	5

- 16 Mélanger doucement en tapotant le tube et centrifuger pendant 3 secondes.

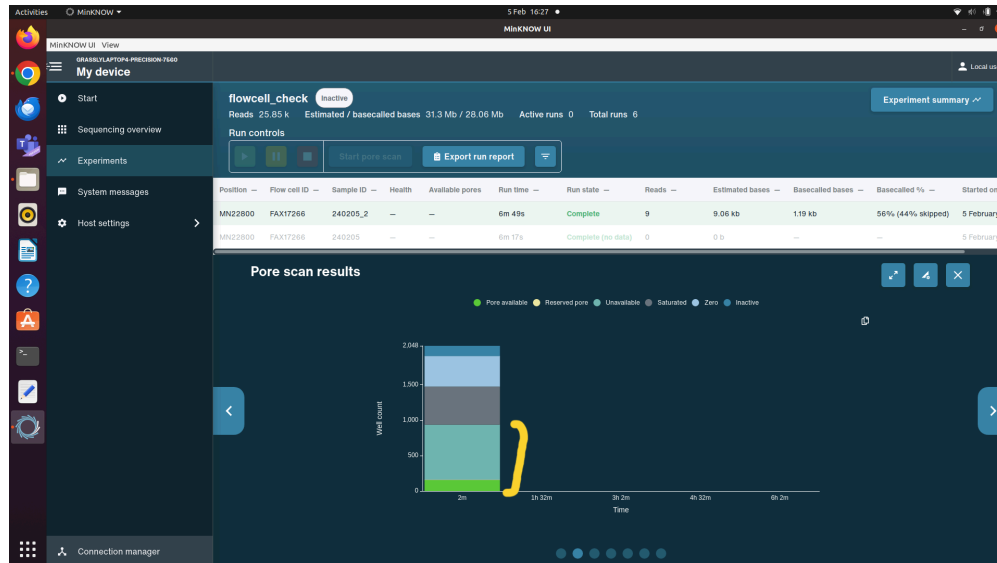
- 17 Incuber la réaction pendant 10 minutes à température ambiante.

- 17.1 Durant ce temps, vous pouvez faire votre vérification de Flow Cell

Branchez votre appareil de séquençage, ouvrez le couvercle et insérez votre Flowcell. Dans le logiciel MinKNOW, accédez au panneau de démarrage, sélectionnez Flowcell check, puis démarrez ("start"). Cela vous indiquera combien de pores sont disponibles pour le séquençage.

Si votre Flow Cell a déjà été utilisée, au lieu d'effectuer une vérification de Flow Cell, démarrez une analyse de séquençage fictive en sélectionnant Démarrer le séquençage ("start sequencing"), nommez l'analyse « flowcell_check », sélectionnez n'importe quel

kit, puis réglez la durée sur 10 minutes, passez à l'examen finale, puis commencez à courir. Au début de l'analyse, il effectuera une brève 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 exemple d'image ci-dessous)).



Si une Flow Cell comporte moins de 700 pores, ne l'utilisez pas pour une analyse DDNS de 96 échantillons. Retirez une autre Flow Cell et effectuez une vérification de la Flow Cell. Le nombre de pores disponibles dans la Flow Cell que vous utilisez doit être noté dans le fichier CSV de l'échantillon dans la colonne « PoresAvilableAtFlowCellCheck » et l'ID de la Flow Cell doit être enregistré dans la colonne « FlowCellID ». Enregistrez également le nombre de fois que la Flow Cell a été utilisée dans la colonne « FlowCellUses ».

- 18 Effectuer une purification de 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 ONT (SFB) et le tampon d'élution (EB) au lieu de 80 % d'éthanol et d'eau.

- 18.1 Vortexer les billes AMPure jusqu'à ce que tous les billes sont bien mélanger.
- 18.2 Ajouter 40 ul de billes AMPure XP remises en suspension à la tube de 1.5 mL et mélanger en tapotant le tube.

Incuber pendant 5 minutes à température ambiante. Tapoter doucement après 2 minutes pour faciliter la liaison des billes.

18.3 Centrifuger pendant 3 secondes, puis peler les billes sur l'aimant jusqu'à ce que l'éluat soit clair et incolore.

18.4 Gardez le tube sur l'aimant et pipettez le surnageant, en évitant de perturber les billes.

18.5 Ajouter 250 uL de Short Fragment Buffer (SFB). Retirez le tube de l'aimant et remettez les billes en suspension dans le SFB en tapotant le tube.

Faites tourner pendant 3 secondes, puis remettez le tube sur l'aimant. Laissez les billes se granuler, puis retirez-les et jetez-les.

Répéter.

18.6 Centrifuger le tube pendant 2 secondes, et remettez-le sur l'étagère magnétique. Pipeter le SFB résiduel.

Sécher à l'air pendant environ 1 minute ou jusqu'à ce qu'il soit sec mais sans se fissurer.

18.7 Retirer le tube de l'étagère magnétique et remettre en suspension les billes dans 15 ul de tampon d'élution (EB). Tapoter pour resuspendre, puis incuber pour 10 minutes à température ambiante.

18.8 Centrifuger pendant 3 secondes, puis peler les billes sur l'étagère magnétique. Laissez les billes culotter complètement.

18.9 Retirez 12 µL de l'ADN élué et transférez-le dans un tube propre de 1,5 ml.

A NOTER:

À ce étape, vous pouvez stocker la bibliothèque préparée à 4°C. Celui-ci peut être conservé jusqu'à une semaine avant de faire le sequencage, mais il est conseillé de continuer le chargement de la Flow Cell dès que possible.

Assurez-vous d'étiqueter clairement le tube avec le nom de l'analyse et à quelle étape de la préparation de la bibliothèque vous vous trouviez, par exemple: 20240229
Bibliothèque finale DDNSrun10

Amorçage et chargement de la Flowcell SpotON



- 19 Décongeler le tampon de séquençage (SB), les billes de bibliothèque (LIB), le Flow Cell Tether (FCT) et un tube de Flow Cell Flush (FCF) à température ambiante et remettre dans la glace une fois décongelés.

Mélangez les tubes de tampon de séquençage (SB), de Flow Cell Flush (FCF) et de Flow Cell Tether (FCT) au vortex, centrifugez et remettez dans la glace.

- 20 Préparez le mélange d'amorçage en ajoutant les reactifs suivant dans un tube propre de 1,5 mL:

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

Bien mélanger le contenu du tube par pipetage, centrifuger, et remettre sur la glace jusqu'au moment de l'utiliser.

- 21 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 port d'amorçage, vérifiez s'il y a de l'air sous le port. Retirez un petit volume pour éliminer les bulles en insérant une pointe de pipette P1000 dans le port d'amorçage et en faisant tourner le piston de la pipette pour augmenter lentement le volume et retirer quelques μL . Assurez-vous que le réseau de pores est recouvert de tampon à tout moment.
- 22 En utilisant une pipette P1000, chargez 800 μL 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 Flowcell. Attendez 5 minutes.
- 23 Bien mélanger le contenu du tube LBII par pipetage.
Préparez la librairie pour le chargement comme suit en ajoutant la SB et la LIB à la librairie 20 fmol préparée:

	A	B
	Réactif	Volume (uL)
	Sequencing Buffer (SB)	37.5
	Library beads (LIB)	25.5

- 24 Soulevez doucement le couvercle du port d'échantillonnage SpotON pour le rendre accessible.

Avec le port d'amorçage et les ports d'échantillonnage ouverts, chargez 200 uL du mélange d'amorçage dans la Flow Cell via **le port d'amorçage** (et non le port d'échantillon SpotON), en évitant l'introduction de bulles d'air.

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

- 25 Mélangez délicatement la librairie préparée en la pipetant de haut en bas juste avant le chargement.

Ajouter goutte à goutte 75 uL 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.

- 26 Remplacez 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 remplacez le couvercle MinION.

Commencer le cycle de séquençage

- 27 Ouvrez le logiciel ONT MinKNOW et suivez les étapes ci-dessous pour configurer et démarrer votre analyse de séquençage.

- 27.1 Cliquez sur Démarrer ("start"), puis démarrez le séquençage ("start sequencing"). Créez un nom pour votre analyse de séquençage, c'est une bonne pratique de le rendre unique et identifiable si jamais vous avez besoin de revoir les données. La date et le nom de l'expérience sont recommandés. Dans le nom de l'échantillon, vous pouvez mettre 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.

- 27.2 Sélectionnez le kit utilisé - il s'agit du SQK-LSK114. Une fois que vous aurez cliqué dessus, les options de codes-barres apparaîtront. Sélectionnez EXP-PBC096, puis cliquez sur continuer ("Continue")
- 27.3 Dans les options de durée d'analyse, définissez la durée d'analyse sur 7 heures pour une analyse de 40 échantillons (environ 10 minutes par échantillon arrondi à l'heure la plus proche). Cliquez sur continuer.
- 27.4 Dans les options d'appel de base, sélectionnez un appel de base de haute précision. Dans les options de code-barres, assurez-vous que le code-barres est activé et activez l'utilisation du code-barres aux deux extrémités. Cliquez sur Continuer jusqu'à ce que vous atteigniez l'aperçu de l'exécution, où vous pouvez vérifier les options sélectionnées, puis cliquez sur Démarrer l'exécution ("start run").
- 27.5 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".

Laver la Flow Cell

- 28 Une fois l'analyse de séquençage terminée, vous pouvez laver votre Flow Cell pour retirer la bibliothèque restante et soit la préparer pour une autre analyse de séquençage, soit la stocker à 4 °C. Le lavage utilise les réactifs fournis dans le kit de lavage

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

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

Faites tourner le tube de mélange de lavage (WMX) et placez-le sur la glace.

- 28.2 Préparez la solution de lavage suivante dans un tube propre de 1,5 ml.

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

- 29 Ouvrez le couvercle du port d'amorçage de la Flow Cell. Retirez un petit volume pour éliminer les bulles en insérant une pointe de pipette P1000 dans le port d'amorçage et en



faisant tourner le piston de la pipette pour augmenter lentement le volume et retirer quelques μL .

- 30 Ajoutez délicatement 400 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 d'une bulle d'air.

Fermez le port d'amorçage et incubez à température ambiante pendant une heure.

- 30.1 Ici, vous pouvez retirer tous les déchets du canal de déchets, en vous assurant que le port d'amorçage est fermé avant de le faire.

Vous pouvez également apposer une étiquette sur l'emballage de la Flow Cell pour détailler la date d'exécution, ce qui a été exécuté dessus et pendant combien de temps, par ex. 13/03/2024 DDNS-run30 7 heures

Si vous envisagez de stocker la Flow Cell en vue d'une réutilisation ultérieure, retirez la bouteille de tampon de stockage du kit de lavage et décongelez-la à température ambiante.

- 31 Après l'incubation, vous pouvez soit suivre les étapes d'amorçage et de chargement de la Flow Cell à partir de l'étape 17 pour charger une nouvelle analyse, soit suivre les étapes suivantes pour stocker la Flow Cell en vue d'une utilisation ultérieure.

- 31.1 Vortexez brièvement le tampon de stockage décongelé pour le mélanger, puis ajoutez lentement 500 μL via le port d'amorçage.

Fermez le port d'amorçage avant de retirer tous les déchets du canal de déchets.

Remettez la Flow Cell dans sa boîte et son enveloppe en plastique, puis conservez-la à 4 °C.