



CURSO DE ENTRENAMIENTO EN "SECUENCIACIÓN DEL GENOMA DE SARS-CoV2 CON LA PLATAFORMA MinION.

PROTOCOLO

- 1. Objetivo*
- 2. Definiciones*
- 3. Materiales/Reactivos*
- 4. Equipos*
- 5. Procedimiento*
- 6. Referencias Bibliográficas*



ELABORADO CHYNTIA DIAZ	VERIFICADO MAGALY MARTINEZ	APROBADO EVA NARA	FECHA 14/06/2021
---------------------------	-------------------------------	----------------------	---------------------



CURSO DE ENTRENAMIENTO EN SECUENCIACIÓN DEL GENOMA DE SARS-CoV2 CON LA PLATAFORMA MinION.

1. OBJETIVO

Procedimiento de secuenciamiento de Sars-CoV-2 por MinION Oxford Nanopore Technologies aplicando PCR en tiempo real a partir de ARN extraído de hisopados nasofaríngeos y orofaríngeos seguido de secuenciamiento para la identificación de Sars-CoV-2.

2. DEFINICIONES

- **Sars-CoV-2:** Severe acute respiratory síndrome. Es un nuevo coronavirus identificado como la causa de la enfermedad por coronavirus del 2019 (COVID-19) que comenzó en Wuhan, China a fines de 2019 y se ha diseminado en todo el mundo, causando una pandemia en 2020.
- **COVID-19:** Coronavirus disease 19. Es una enfermedad respiratoria aguda, que puede causar desde un resfriado común hasta enfermedades graves.

3. MATERIALES/REACTIVOS

Componente	Empresa	número
ARTIC nCoV-2019 V3 panel (100uM)	IDT	*
LunaScript RT SuperMix Kit	NEB	E3010
Q5 Hot Start HF Polymerase or	NEB	M0493
Q5 Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix	NEB	M0494
dNTP Solution Mix (10 mM ea.)	NEB	N0447
Nuclease-free water (100 mL)	NEB	B1500
NEBNext Ultra II End Repair/dA-tailing module	NEB	E7546
Blunt/TA Ligase Master Mix	NEB	M0367
Native Barcoding Expansion Kit 1-12 and/or	ONT	EXP-NBD104
Native Barcoding Expansion Kit 13-24 or	ONT	EXP-NBD114
Native Barcoding Expansion Kit 96	ONT	EXP-NBD196
AMPure XP beads	Beckman	A63881
NEBNext Quick Ligation Module	NEB	E6056S

ELABORADO CHYNTIA DIAZ	VERIFICADO MAGALY MARTINEZ	APROBADO EVA NARA	FECHA 14/06/2021
---------------------------	-------------------------------	----------------------	---------------------





CURSO DE ENTRENAMIENTO EN SECUENCIACIÓN DEL GENOMA DE SARS-CoV2 CON LA PLATAFORMA MinION.

Sequencing Auxiliary Vials	ONT	EXP-AUX001
Short Fragment Buffer Expansion Kit	ONT	EXP-SFB001
Qubit dsDNA HS Assay Kit	Thermo	Q32854
Flow Cell Priming Kit	ONT	EXP-FLP002
Flow Cell Wash Kit (opcional)	ONT	EXP-WSH003
R9.4.1 flow cells	ONT	FLO-MIN106

**IDT premixed ARTIC nCoV-2019 V3 panel or order oligos individually.*

4. EQUIPOS

- 4.1 Cabina de preparación de master mix, cuarto blanco.
- 4.2 Cabina de cargado de muestras, cuarto gris.
- 4.3 Termociclador
- 4.4 Freezer para almacenar reactivos (cuarto blanco) y RNA (seroteca).
- 4.5 Freezer para almacenar muestras biológicas a ser procesadas (cuarto de extracción con cabina BSL2).

5. PROCEDIMIENTO

- 5.1 Instalación de software en computadora.
- 5.2 Control de calidad de Flow cells
- 5.3 Experimento de control con lambda-Lambda Control Experiment (SQK-LSK109)
 - 5.3.1 Resumen del protocolo

Características del kit de secuenciación de ligadura. Este kit está recomendado para usuarios que:

- *quieren optimizar su experimento de secuenciación para el rendimiento
- *les gustaría utilizar procesos ascendentes como la selección de tamaño, amplificación del genoma completo o el enriquecimiento para lecturas largas

ELABORADO CHYNTIA DIAZ	VERIFICADO MAGALY MARTINEZ	APROBADO EVA NARA	FECHA 14/06/2021
---------------------------	-------------------------------	----------------------	---------------------





CURSO DE ENTRENAMIENTO EN SECUENCIACIÓN DEL GENOMA DE SARS-CoV2 CON LA PLATAFORMA MinION.

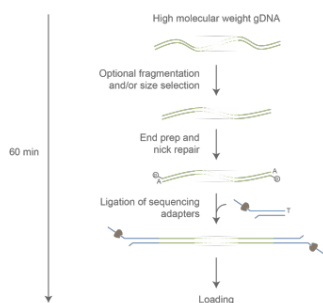
Introducción al protocolo de Experimento de control Lambda:

Este protocolo describe cómo llevar a cabo la secuenciación de una muestra de ADN de control Lambda utilizando el Ligation Sequencing Kit (SQK-LSK109) y el Control Expansión (EXP-CTL001). Prepárate para tu experimento. Necesitarás:

- kit de secuenciación, el equipo correcto y reactivos
- Descarga el software para adquirir y analizar tus datos
- Verifique su celda de flujo para asegurarse de que tenga suficientes poros para una buena secuenciación

Preparación de la biblioteca. Necesitarás:

- Reparar el ADN y preparar los extremos del ADN para la conexión del adaptador
- Conecte los adaptadores de secuenciación suministrados en el kit a los extremos del ADN
- Ceba la celda de flujo y cargue su biblioteca de ADN en la celda de flujo



Secuenciación y análisis. Necesitarás:

- Inicie una ejecución de secuenciación utilizando el software MinKNOW, que recopilará datos sin procesar del dispositivo y los convertirá en lecturas denominadas base
- Alinee los datos denominados base con el genoma Lambda utilizando el software EPI2ME

ELABORADO CHYNTIA DIAZ	VERIFICADO MAGALY MARTINEZ	APROBADO EVA NARA	FECHA 14/06/2021
---------------------------	-------------------------------	----------------------	---------------------





CURSO DE ENTRENAMIENTO EN SECUENCIACIÓN DEL GENOMA DE SARS-CoV2 CON LA PLATAFORMA MinION.

Equipo y consumibles

Kit de secuenciación de ligadura de materiales (SQK-LSK109)

Expansión de control (EXP-CTL001)

Kit de cebado de celda de flujo (EXP-FLP002)

Consumibles Cuentas Agencourt AMPure XP

Módulo complementario NEBNext® para secuenciación de ligadura de Oxford Nanopore Technologies® (cat # E7180S).

Alternativamente, puede utilizar los tres productos NEBNext® a continuación:

NEBNext FFPE Repair Mix (M6630)

NEBNext Ultra II

End repair/dA-tailing Module (E7546)

NEBNext Quick Ligation Module (E6056)

1.5 ml Eppendorf DNA LoBind tubos

0.2 ml thin-walled PCR tubos

Nuclease-free water (e.g. ThermoFisher, cat # AM9937)

Etanol 70% fresco en agua libre de nucleasa

Equipos:

Mezclador Hula (mezclador rotatorio suave)

Separador magnético, apto para tubos Eppendorf de 1,5 ml

Microcentrífuga

Mezclador Vortex

Termociclador



ELABORADO CHYNTIA DIAZ	VERIFICADO MAGALY MARTINEZ	APROBADO EVA NARA	FECHA 14/06/2021
---------------------------	-------------------------------	----------------------	---------------------





CURSO DE ENTRENAMIENTO EN SECUENCIACIÓN DEL GENOMA DE SARS-CoV2 CON LA PLATAFORMA MinION.

Pipeta y puntas P1000, P200, P100, P20, P10

Cubo de hielo con hielo

Temporizador

Equipos opcionales:

Agilent Bioanalyzer (o equivalente)

Fluorómetro Qubit (o equivalente para control de control de calidad)

Centrífuga Eppendorf 5424 (o equivalente)

Para este protocolo, necesitará el Lambda DNA (LMD) suministrado en el paquete de expansión de control.

Recomendamos cargar 1 µg (o 100-200 fmol) de ADN lambda para las celdas de flujo R9.4.1. Para R10.3, cargue 1.5-3 µg (o 150-300 fmol).

Módulo complementario NEBNext® para la secuenciación de ligadura de Oxford Nanopore Technologies®.

Para los clientes nuevos en la secuenciación de nanoporos, se recomienda comprar el módulo complementario NEBNext® para la ligadura de Oxford Nanopore Technologies®

Secuenciación (número de catálogo E7180S), que contiene todos los reactivos NEB necesarios para su uso con el kit de secuenciación de ligadura.

ELABORADO CHYNTIA DIAZ	VERIFICADO MAGALY MARTINEZ	APROBADO EVA NARA	FECHA 14/06/2021
---------------------------	-------------------------------	----------------------	---------------------





CURSO DE ENTRENAMIENTO EN "SECUENCIACIÓN DEL GENOMA DE SARS-CoV2 CON LA PLATAFORMA MinION.

Contenido del kit de secuenciación de ligadura (SQK-LSK109)



LFB : L fragment buffer SFB : S fragment buffer
LNB : Ligation buffer EB : Elution buffer
SQB : Sequencing buffer SQT : Sequencing tether
DCS : DNA control strand LB : Loading beads
AMX : Adapter mix

Control Expansion (EXP-CTL001) contents



LMD : Lambda DNA (50 µg/ml)

Flow Cell Priming Kit (EXP-FLP002) contents



FLB : Flush buffer
FLT : Flush tether

Requisitos informáticos y software

Requisitos de TI de MinION Mk1B: A menos que esté utilizando un dispositivo MinIT, la secuenciación en un MinION Mk1B requiere una computadora o computadora portátil de alta especificación para mantenerse al día con la tasa de adquisición de datos.

Lea más en el documento Requisitos de TI de MinION.

Software para secuenciación de nanoporos. MinKNOW

El software MinKNOW controla el dispositivo de secuenciación de nanoporos, recopila datos de secuenciación en tiempo real y los procesa en *basecalls* ("llamadas base"). Estarás usando MinKNOW para cada experimento de secuenciación. MinKNOW también puede demultiplexar lecturas por código de barras y datos de llamada base / demultiplexación después de que se haya realizado una corrida de secuenciación terminada.

Uso de MinKNOW

ELABORADO	VERIFICADO	APROBADO	FECHA
CHYNTIA DIAZ	MAGALY MARTINEZ	EVA NARA	14/06/2021





CURSO DE ENTRENAMIENTO EN SECUENCIACIÓN DEL GENOMA DE SARS-CoV2 CON LA PLATAFORMA MinION.

Para obtener instrucciones sobre cómo ejecutar el software MinKNOW, consulte la sección correspondiente del protocolo MinKNOW.

EPI2ME (opcional)

La plataforma basada en la nube EPI2ME realiza un análisis adicional de los datos denominados base, por ejemplo, la alineación con el genoma Lambda, códigos de barras o clasificación taxonómicos. Utilizará la plataforma EPI2ME solo si desea un análisis más detallado de sus datos después de la llamada base.

Instalación y uso de EPI2ME

Para obtener instrucciones sobre cómo crear una cuenta EPI2ME e instalar el Agente de escritorio EPI2ME, consulte el protocolo de la plataforma EPI2ME.

Revise su celda de flujo

Recomendamos encarecidamente que verifique el número de poros en su celda de flujo antes de comenzar un experimento de secuenciación. Esto debe hacerse dentro de tres meses después de la compra de celdas de flujo MinION / GridION / PromethION, o dentro de las cuatro semanas posteriores a la compra de celdas de flujo Flongle. Oxford Nanopore Technologies reemplazará cualquier celda de flujo con menos poros que el número de poros en la tabla a continuación, cuando el resultado se informe dentro de los dos días de realizar la verificación de la celda de flujo, y cuando se hayan seguido las recomendaciones de almacenamiento. Para realizar la verificación de la celda de flujo, siga las instrucciones del documento Verificación de la celda de flujo.

Flow cell	Minimum number of active pores covered by warranty
Flongle Flow Cell	50
MinION/GridION Flow Cell	800
PromethION Flow Cell	5000

ELABORADO CHYNTIA DIAZ	VERIFICADO MAGALY MARTINEZ	APROBADO EVA NARA	FECHA 14/06/2021
---------------------------	-------------------------------	----------------------	---------------------





CURSO DE ENTRENAMIENTO EN SECUENCIACIÓN DEL GENOMA DE SARS-CoV2 CON LA PLATAFORMA MinION.

Reparación y preparación final del ADN (aprox 35 minutos).

***Materiales**

Lambda DNA (LMD)

ADN CS

***Consumibles**

Tubos de PCR de pared fina de 0,2 mL

Tubos Eppendorf DNA LoBind de 1,5 mL

Agua sin nucleasas (por ejemplo, ThermoFisher, cat # AM9937)

Mezcla de reparación de ADN NEBNext FFPE (M6630)

NEBNext Ultra II Módulo de reparación final / dA-tailing (E7546)

Cuentas Agencourt AMPure XP

Etanol al 70% recién preparado en agua sin nucleasas

Equipos

Pipeta y puntas P1000, P100, P20, P10

Termociclador a 20 ° C y 65 ° C

Microcentrífuga

Mezclador Hula (mezclador rotatorio suave)

Rejilla magnética

Cubo de hielo con hielo

ELABORADO

CHYNTIA DIAZ

VERIFICADO

MAGALY MARTINEZ

APROBADO

EVA NARA

FECHA

14/06/2021



CURSO DE ENTRENAMIENTO EN "SECUENCIACIÓN DEL GENOMA DE SARS-CoV2 CON LA PLATAFORMA MinION.

1- Descongelar DNA CS (DCS) y Lambda DNA (LMD) a temperatura ambiente, centrifugar (spin down), mezclar suavemente pipeteando y colocar en hielo.

2-Prepare los reactivos *NEBNext FFPE DNA Repair Mix* y *NEBNext Ultra II End Repair / dA tailing Module* de acuerdo con instrucciones del fabricante y colóquelo en hielo.

OBS: *NEBNext FFPE DNA Repair Mix* no se compró.

3- En un tubo de 0.2 mL de pared delgada, mezcle lo siguiente:

Reagent	Volume if using R9.4.1 flow cells	Volume if using R10.3 flow cells
Nuclease-free water	27 µl	7 µl
Lambda DNA (50 µg/ml)	20 µl	40 µl
DNA CS (DCS)	1 µl	1 µl
NEBNext FFPE DNA Repair Buffer	3.5 µl	3.5 µl
NEBNext FFPE DNA Repair Mix	2 µl	2 µl
Ultra II End-prep reaction buffer	3.5 µl	3.5 µl
Ultra II End-prep enzyme mix	3 µl	3 µl
Total	60 µl	60 µl

Mezcle suavemente moviendo el tubo y centrifugue. Con un termociclador, incube a 20 °C durante 5 minutos y a 65 °C durante 5 minutos.

IMPORTANTE

Limpieza de microesferas AMPure XP. Se recomienda que la muestra de ADN reparada/preparada al final se someta a la siguiente limpieza con perlas AMPure XP. Esta limpieza puede ser omitido por simplicidad y para reducir el tiempo de preparación de la biblioteca. Sin embargo, se ha observado que la omisión de esta limpieza puede: reducir la eficiencia de la ligadura del adaptador, aumenta la prevalencia de lecturas quiméricas y conduce a un aumento de los poros que no están disponibles para la secuenciación. Si omite el paso de limpieza, continúe con la siguiente sección.

ELABORADO CHYNTIA DIAZ	VERIFICADO MAGALY MARTINEZ	APROBADO EVA NARA	FECHA 14/06/2021
---------------------------	-------------------------------	----------------------	---------------------



CURSO DE ENTRENAMIENTO EN SECUENCIACIÓN DEL GENOMA DE SARS-CoV2 CON LA PLATAFORMA MinION.

5.4 Preparación del material para secuenciamiento

ANTES DE EMPEZAR

Prepare entre 11 y 95 muestras de ARN más 1 control negativo utilizando este protocolo.

PASOS:

- *cDNA preparación
- *Primer pool preparación (opcional) o usar IDT ARTIC nCoV-2019 V3 Panel
- *Multiplex PCR (4h)
- *Dilución de productos de PCR
- *Barcoding
- * MinION sequencing

cDNA preparacion (30 min)

OBS: Para todo el proceso: Usar guantes de acrílico y EPP. Usar pipetas calibradas. Usar puntas RNAsa y DNAsa free con filtro.

- 1- En el **cuarto blanco**, irradiar con luz UV la cabina de preparación de la mezcla de reacción, por 10 minutos. Registrar en la planilla.
- 2- Calcular el volumen necesario de la mezcla de reacción, para la cantidad de muestras a ser amplificadas. Preparar el número de muestras + 1, de mezcla de reacción, debido a que los volúmenes utilizados son muy pequeños y pueden perderse durante la transferencia de la mezcla a los tubos individuales. Mezcle los siguientes componentes en una placa / tubos de tiras de PCR. Mezcle suavemente pipeteando y centrifugue el tubo para recoger líquido. Realizar los cálculos considerando las proporciones del siguiente esquema:

ELABORADO	VERIFICADO	APROBADO	FECHA
CHYNTIA DIAZ	MAGALY MARTINEZ	EVA NARA	14/06/2021





CURSO DE ENTRENAMIENTO EN SECUENCIACIÓN DEL GENOMA DE SARS-CoV2 CON LA PLATAFORMA MinION.

FECHA: placa Nº : Responsable: Lote de Reactivo:

INSTRUMENTO:

LunaScript RT superMix		
MasterMix	1 Reacción	X reacciones
LunaScript RT SuperMix (5X)	2 uL	
Template RNA	8 uL	
Total volumen	10 uL	

Protocolo de Ciclado		
25°C	2 min	1X
55°C	10 min	1X
95°C	1 min	1X

El input de ARN viral de una muestra clínica debe estar entre Ct 18-35 de la PCR de diagnóstico. Si Ct está entre 12-15, diluya la muestra 100 veces en agua, si está entre 15-18, diluya 10 veces en agua. Esto reducirá la probabilidad de inhibición de la PCR.

Registrar en la planilla el orden en que van a ser agregadas las muestras en los tubos que contienen la mezcla de reacción. Modelo de planilla:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

ELABORADO CHYNTIA DIAZ	VERIFICADO MAGALY MARTINEZ	APROBADO EVA NARA	FECHA 14/06/2021
---------------------------	-------------------------------	----------------------	---------------------





CURSO DE ENTRENAMIENTO EN SECUENCIACIÓN DEL GENOMA DE SARS-CoV2 CON LA PLATAFORMA MinION.

Para evitar la contaminación previa a la PCR, la mezcla maestra debe agregarse a los tubos / placa de tiras de PCR en el gabinete mastermix que debe limpiarse con toallitas descontaminantes y esterilizarse con UV antes y después de su uso. Las muestras de ARN deben agregarse en el gabinete de extracción / adición de muestras, que debe limpiar con toallitas descontaminantes y esterilizar con UV antes y después de su uso.

En cuarto de adición de muestras irradiar con luz UV la cabina por 10 minutos. Registrar en la planilla. Prepare entre 11 y 95 muestras de ARN más 1 control negativo de agua libre de nucleasas por biblioteca. Si previamente congelado, mezcle agitando brevemente con vórtex y centrifugando para recoger el líquido. Mantenga las muestras en hielo en todo momento. Se requieren al menos 11 muestras para tener suficiente material para cargar en el secuenciador al final. Si usted procesó > 23 necesitará el kit de expansión EXP-NBD196. También se puede incluir un control positivo que puede ser una construcción de ARN sintético o una muestra clínica de alto título que se puede diluir. Esto puede ayudar a controlar el rendimiento de la ejecución.

Multiplex PCR 4h

Configure las dos reacciones de PCR por muestra de la siguiente manera en tubos de tiras o placas: Mezcle suavemente pipeteando y centrifugue tubo para recoger líquido en el fondo del tubo. Los cebadores se utilizan a una concentración final de 15 nanomolar (nM) por cebador. Los pools V3 tienen 110 cebadores en el grupo 1 y 108 cebadores en el grupo 2, por lo que el requisito es ~ 4 µl del grupo de cebadores (10 micromolar (µM)) por 25 µl de reacción. Prepare varias alícuotas de 100 µl de diluciones de primers 10 micromolar (µM) y congélelas para evitar caso de degradación o contaminación.

Obs: Q5 Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix también se puede utilizar en lugar del kit de componentes. Las reacciones de PCR a media fórmula también se pueden utilizar para ahorrar costos, ya que solo necesitará 2,5 µl para los pasos posteriores.

Para evitar la contaminación pre-PCR, la mezcla maestra de cada grupo debe prepararse en la mezcla maestra gabinete que debe limpiarse con toallitas descontaminantes y esterilizarse

ELABORADO	VERIFICADO	APROBADO	FECHA
CHYNTIA DIAZ	MAGALY MARTINEZ	EVA NARA	14/06/2021





CURSO DE ENTRENAMIENTO EN SECUENCIACIÓN DEL GENOMA DE SARS-CoV2 CON LA PLATAFORMA MinION.

con UV antes y después de su uso y dividido en alícuotas en tubos / placa de tiras de PCR. REALIZAR EN CUARTO BLANCO.

Trasladar los tubos al cuarto gris. En la cabina del cuarto de gris añada 2,5 µl de cDNA a cada una de las reacciones de PCR, mezcle suavemente pipeteando y centrifugue el tubo para recoger el líquido en el fondo del tubo. Se puede agregar hasta 5 µl de cDNA a cada tubo de reacción (quitando 2,5 µl de H₂O RNase free del mix) para mejorar la amplificación de muestras con bajo título. El uso de 5 µl de cDNA va a requerir una mezcla de reacción de cDNA de 20 µl, y puede tener un efecto inhibitorio, por lo que se debe usar con cuidado. Agregar 2,5 µl (Agua destilada RNase free) como control negativo en un pocillo. Antes y luego del uso, limpiar la cabina del cuarto de aplicación de cDNA con alcohol 70%. Irradiar por 10 minutos con luz UV la cabina dejando adentro la caja de punteras y la pipeta.

Componente	Reacción 1 (µL)	Reacción 2 (µL)	Media fla
Q5 Hot Star High Fidelity 2X Master MIX	12,5	12,5	6,25
V3 Pool 1 (10 uM)	4	0	2
V3 Pool 2 (10 uM)	0	*4	*
H2O	6	6	3
Total	22,5	22,5	11,25

Paso	Temp	Tiempo	Ciclos
Inactivación	98°C	30 min	1
Desnaturalización	98°C	15 min	25-30
Annealing	65°C	5 min	25-30
Hold	4°C	infinito	1

El numero de ciclos debe ser 25 para Ct de 18-21 y hasta 35 para Ct35

Colocar los tubos en el termociclador Applied Biosystems. Seleccionar la plantilla con las condiciones de ciclado. (Duración aproximada 2 horas). La calibración del termociclador puede variar de un instrumento a otro. Si ve dropout del amplicón 64, disminuya la

ELABORADO CHYNTIA DIAZ	VERIFICADO MAGALY MARTINEZ	APROBADO EVA NARA	FECHA 14/06/2021
---------------------------	-------------------------------	----------------------	---------------------





CURSO DE ENTRENAMIENTO EN SECUENCIACIÓN DEL GENOMA DE SARS-CoV2 CON LA PLATAFORMA MinION.

temperatura de annealing / extensión a 63 °C. También se puede utilizar una temperatura de desnaturalización de 95 °C que puede aumentar ligeramente los rendimientos de la PCR.

Guardar los productos de PCR en la heladera del cuarto de Equipos Especializados. Realizar una corrida en gel de agarosa al 1% con un Ladder que tenga el tamaño de producto esperado, que son unas 400 pares de bases. Luego de realizar este paso de control de calidad se procede a realizar el pool de productos de PCR.

POOL y DILUCION DE LOS PRODUCTOS DE PCR MULTIPLEX (POOL 1 Y 2). 10 min

Etiquete los tubos de tira / placa y combine los siguientes volúmenes de cada reacción de PCR:

Componente	Volumen
Pool 1 PCR	2.5 µL
Pool 2 PCR	2.5 µL
H2O RNase Free	45 µL
Total	50 µL

La concentración de PCR posterior a la limpieza suele ser de alrededor del 100% de masa. Esto significa que hacer el pool sin cuantificación / normalización para hacer un ahorro de tiempo significativo. Si necesitas una cantidad bien pareja de barcodes, entonces realice la limpieza y normalice al [M] 10 por ciento de masa y luego continúe

Los amplicones deben agregarse en la cabina post-PCR que debe limpiarse con descontaminación toallitas y esterilizadas con UV antes y después de su uso.

NATIVE BARCODING. 2h

Coloque códigos de barras a los pools de amplicones utilizando el enfoque de código de barras nativo de un solo recipiente. Protocolo: Código de barras nativo de un solo recipiente de amplicones v3 (LoCost) por Josh Quick.

ELABORADO CHYNTIA DIAZ	VERIFICADO MAGALY MARTINEZ	APROBADO EVA NARA	FECHA 14/06/2021
---------------------------	-------------------------------	----------------------	---------------------





CURSO DE ENTRENAMIENTO EN SECUENCIACIÓN DEL GENOMA DE SARS-CoV2 CON LA PLATAFORMA MinION.

En un nuevo tubo / placa de tiras de PCR, configure la siguiente reacción para cada muestra (reactivos en freezer de equipos especializados):

OBS: tener hielo a mano

COMPONENTE	VOLUMEN
POOL diluido del paso anterior	3.3 uL
Ultra II End Prep Reaction Buffer	1.2 uL*
Ultra II End Prep Enzyme Mix	0.5 uL*
H2O nucleasa free	5 uL*
Total	10 uL

**Preparar mix (sin muestra), repartir 6.7 ul en cada tubo y luego agregar 3.3 del PCR pool diluido.*

Colocar los tubos en el termociclador

Incubar a temperatura ambiente por 15 min.

Incubar a 65C por 15 min.

Incubar en hielo por 1 minuto

En un nuevo tubo / placa de tiras de PCR, configure la siguiente reacción para cada muestra (reactivos en freezer de Equipos Especializados):

COMPONENTE	VOLUMEN
End-preparation reaction mixture	0.75 uL
NBXX Barcode	1.25 uL
Blunt/TA Ligase Master Mix	5 uL
H2O nucleasa free	3 uL
Total	10 uL

ELABORADO CHYNTIA DIAZ	VERIFICADO MAGALY MARTINEZ	APROBADO EVA NARA	FECHA 14/06/2021
---------------------------	-------------------------------	----------------------	---------------------





CURSO DE ENTRENAMIENTO EN "SECUENCIACIÓN DEL GENOMA DE SARS-CoV2 CON LA PLATAFORMA MinION.

Incubar a temperatura ambiente por 20 min

Incubar a 65 °C por 10 min

Incubar en hielo por 1 min

La incubación a 65 °C es necesaria para inactivar la DNA ligase y así prevenir cross-ligación de los barcodes cuando los mismos se mezclan ("poolean") en el próximo paso.

POOL DE BARCODES:

En un nuevo eppendorf de 1.5 mL prepare un pool de todas las reacciones barcode. Para "poolear" se debe hacer un spin previo de cada tubo. Y al final del preparado del pool también se realiza un spin.5

Si procesa de **12-24** muestras, prepare el pool con **10 uL** de cada reacción de barcoding.

Si procesa **48** muestras, prepare el pool con **5 uL** de cada reacción barcoding.

Si procesa **96** muestras, prepare el pool con **2.5 uL** de cada reacción barcoding, de tal manera a no superar un volumen de **240 uL**, porque de lo contrario se complicaría el proceso de limpieza (clean-up).

Los Barcodes (BCs) se pueden comprar en tandas de 1 a 12, de 13 a 24 etc. Pero nosotros compramos el de 96 BCs. Entonces se debe asignar BC a cada muestra. Codificación interna consistirá en: BCXXX (001 a 100) porque el compromiso con conacyt es hasta 100 muestras secuenciadas. Se tiene que anotar que BCs se usaron para un determinado flowcell. Al reutilizar un flowcell se deben utilizar otro BCs.

UNIÓN A BEADS:

Los beads se encuentran en la heladera del cuarto de equipos especializados. El frasco se vortexeo antes de abrirlo, luego se alicuotó en volúmenes de 500 uL en eppendorfs de 1.5 mL.

Agregue 0.4x de volumen de perlas SPRI al tubo de muestra y mezcle suavemente agitando o pipeteando. Por ejemplo, agregue 96 µl de perlas SPRI a 240 µl de reacciones de códigos de barras de un solo recipiente. 0.4x de volumen de SPRI es suficiente para unir amplicones de 400 bp en presencia de tampón de ligación, no use 1x como esto dará como resultado un granulado excesivo de perlas. Mezcle mediante agitación vórtex y centrifugue por pulsos para recoger todo el líquido en el fondo del tubo. Incubar durante 05 min. a temperatura ambiente.

ELABORADO CHYNTIA DIAZ	VERIFICADO MAGALY MARTINEZ	APROBADO EVA NARA	FECHA 14/06/2021
---------------------------	-------------------------------	----------------------	---------------------



CURSO DE ENTRENAMIENTO EN SECUENCIACIÓN DEL GENOMA DE SARS-CoV2 CON LA PLATAFORMA MinION.

Coloque en una rejilla magnética e incube durante 02 min o hasta que las perlas se hayan sedimentado y el sobrenadante esté completamente claro. Retire con cuidado y deseche el sobrenadante, teniendo cuidado de no tocar el gránulo de perlas.

Buscar el kit SFB 001 Expansion. Agregue 250 µl de SFB y resuspenda las perlas completamente mezclando con una pipeta. Centrifuga de pulsos para recoger todo el líquido en el parte inferior del tubo y colóquelo en el imán. Retire el sobrenadante y deséchelo (*). El SFB eliminará el exceso de adaptador sin dañar los complejos adaptador-proteína. No use etanol al 70% como en las limpiezas tempranas.

Repita los pasos (*) para realizar un segundo lavado SFB. Hacer spin y eliminar cualquier SFB residual. No es necesario dejar que se seque al aire con lavados SFB. Agregue 200 µl de etanol al 70% en volumen a temperatura ambiente para bañar el sedimento. Retirar y desechar con cuidado etanol, teniendo cuidado de no tocar el pellet de perlas. Realice solo 1 lavado con etanol al 70%. Hacer spin con la centrifuga para recoger todo el líquido en el fondo del tubo y eliminar con cuidado la mayor cantidad posible de etanol residual utilizando una pipeta P10. Con la tapa del tubo abierta, incube durante 1 min o hasta que el pellet pierda su brillo (si el pellet se seca completamente, lo hará agrietarse y volverse difícil de resuspender). Resuspenda el pellet en 30 µl de *Tris 10 milimolar (mM) pH 8.0*. En vez de *Tris* se utilizó *Elution Buffer NEB*, mezcle suavemente agitando o pipeteando e incubar durante 2 min. Colóquelo en un rack con imán y transfiera la muestra a un tubo Eppendorf limpio de 1,5 ml, asegurándose de que no se transfieran perlas a este tubo. Cuantifique 1 µl de los amplicones con código de barras utilizando el fluorómetro.

LIGADURA DEL APADTADOR

En un nuevo Eppendorf de 1,5 µl configure la siguiente reacción de ligadura del adaptador AMII.

Componente	Volumen
Barcoded amplicon pool	30 µL
NEBNext Quick Ligation Reaction Buffer (5X)* ‡	10 µL
Adapter Mix (AMII). **	5 µL
Quick T4 DNA Ligase ‡	5 µL
Total	50 µL

ELABORADO CHYNTIA DIAZ	VERIFICADO MAGALY MARTINEZ	APROBADO EVA NARA	FECHA 14/06/2021
---------------------------	-------------------------------	----------------------	---------------------





CURSO DE ENTRENAMIENTO EN SECUENCIACIÓN DEL GENOMA DE SARS-CoV2 CON LA PLATAFORMA MinION.

Incubar a temperatura ambiente durante 20 minutos.

Añada 50 µl (1: 1) de beads SPRI al tubo de muestra y mezcle suavemente agitando o pipeteando. Haga spin para recoger todo el líquido en el fondo del tubo. Agite en el vórtex los beads SPRI antes de usarlas para asegurarse de que estén bien resuspendidas, la solución debe ser un color marrón homogéneo. Habrá alguna variación en las eficiencias de limpieza, pero se espera llevar alrededor del 50% a través de esta limpieza. Incubar 5 minutos a temp ambiente. Coloque en una rejilla magnética e incube durante 2 min o hasta que los beads se hayan sedimentado y el sobrenadante esté completamente claro. Retire con cuidado y deseche el sobrenadante, teniendo cuidado de no tocar el pellet de perlas. Agregue 250 µl de SFB y resuspenda los beads completamente mezclando con una pipeta. Haga spin para recoger todo el líquido parte inferior del tubo. Retire el sobrenadante y deséchelo. SFB eliminará el exceso de adaptador sin dañar los complejos adaptador-proteína. No use etanol al 70% como en las limpiezas anteriores. Repetir el lavado con SFB. Haga spin y elimine cualquier SFB residual. Agregue 15 µl de EB (ONT) y resuspenda las perlas mezclando con una pipeta. No es necesario dejar que se seque al aire con los lavados SFB. Incubar a temp ambiente por 2 minutos. Coloque en una rejilla magnética hasta que esté transparente. Transfiera la biblioteca final a un nuevo tubo Eppendorf de 1,5 mL.

Cuantifique 1 µl de la biblioteca final utilizando el fluorómetro Qubit. La concentración varía según el número y el Ct de muestras, pero generalmente se requieren 15 ng de biblioteca final para lograr producir la eficiencia máxima.

La biblioteca final ahora se puede almacenar en 10 milimolar (mM) Tris pH8 a 4 ° C hasta una semana si necesario, de lo contrario, proceda directamente a la secuenciación de MinION.

MinION sequencing

Cebe la flowcell y cargue 15 ng de la biblioteca de secuenciación en la celda de flujo. Por experiencia, sabemos que 15 ng es la cantidad de carga óptima para amplicones cortos. Una caída de velocidad durante la ejecución indica que se cargó un exceso de biblioteca. Un rendimiento de ejecución bajo <20 M de lectura indica una biblioteca insuficiente.

Descongele los siguientes reactivos a temperatura ambiente antes de colocarlos en hielo:

Tampón de secuenciación (SQB)-Sequencing buffer

ELABORADO CHYNTIA DIAZ	VERIFICADO MAGALY MARTINEZ	APROBADO EVA NARA	FECHA 14/06/2021
---------------------------	-------------------------------	----------------------	---------------------





CURSO DE ENTRENAMIENTO EN SECUENCIACIÓN DEL GENOMA DE SARS-CoV2 CON LA PLATAFORMA MinION.

Carga de perlas (LB)-Loading beads

Tampón de vaciado (FLB)-Flush buffer

Enjuague (FLT)-Flush tether

Añada 30 µl de FLT al tubo de FLB y mezcle bien con vórtex.

Si necesario, coloque una nueva celda de flujo MinION en el MinION abriendo el borde y empujando un extremo de la celda de flujo debajo del clip y empujando suavemente hacia abajo. Rote la tapa del puerto de entrada en el sentido de las agujas del reloj 90 ° para que el puerto de cebado sea visible. Tome una pipeta P1000 y una punta y ajuste el volumen a 800 µl. Coloque la punta en el puerto de entrada y sostenga perpendicularmente al plano del pozo de flujo, elimine el aire del puerto de entrada girando el dial de volumen en sentido antihorario. Tenga cuidado de no eliminar tanto volumen que introduzca aire en la matriz rectangular a través de la salida. Cargue 800 µl de FLB (más FLT) en la celda de flujo a través del puerto de entrada, dispense lenta y suavemente tratando de evitar la introducción de posibles burbujas de aire. Espere 5 minutos. Cargue otros 200 µl de FLB (más FLT) en la celda de flujo a través del puerto de entrada, esto iniciará un sifón en el SpotON puerto para permitirle cargar la dilución de la biblioteca.

En un tubo nuevo, prepare la dilución de la biblioteca para la secuenciación:

Component	Volume
SQB	37.5 µL
LB	25.5 µL
Library	12 µL
Total	75 µL

Mezcle LB inmediatamente antes de usar, ya que se asientan rápidamente. Completar con EB si se requieren menos de 12 µL de biblioteca. Mezcle suavemente la biblioteca preparada pipeteando hacia arriba y hacia abajo justo antes de cargarla. Agregue la dilución de la biblioteca de 75 µl a la celda de flujo a través del puerto de muestra SpotON en forma de gota. Asegúrate de cada gota

ELABORADO CHYNTIA DIAZ	VERIFICADO MAGALY MARTINEZ	APROBADO EVA NARA	FECHA 14/06/2021
---------------------------	-------------------------------	----------------------	---------------------





CURSO DE ENTRENAMIENTO EN SECUENCIACIÓN DEL GENOMA DE SARS-CoV2 CON LA PLATAFORMA MinION.

entre en el puerto antes de agregar el siguiente. Vuelva a colocar con cuidado la tapa del puerto de muestra SpotON, asegurándose de que el tapón entre en el puerto SpotON, cierre el puerto de entrada y cierre la tapa del MinION.

Inicie la ejecución de secuenciación utilizando MinKNOW.

*Si utiliza la llamada base en vivo, asegúrese de activar los códigos de barras de dos extremos en la configuración de la llamada base.

*Si es necesario, conecte el MinION a la computadora y espere a que se detecten el MinION y la celda de flujo.

* Elija la celda de flujo en el menú desplegable.

* Luego seleccione la celda de flujo para que aparezca una marca.

* Haga clic en el botón 'Nuevo experimento' en la parte inferior izquierda de la pantalla.

* En la pantalla emergente 'Nuevo experimento', seleccione los parámetros en ejecución para su experimento en las pestañas individuales:

Experimento: nombre la ejecución en el campo de experimento, deje el campo de muestra en blanco.

Kit. Selección: seleccione LSK109 ya que no hay opción para el código de barras nativo (NBD104).

Opciones de ejecución: establezca la duración de la ejecución en 6 horas (puede detener la ejecución una vez que se hayan recopilado suficientes datos como determinado usando RAMPART).

Llamada base (Base calling): deje la llamada base activada pero seleccione 'llamada base rápida'.

Salida (output): la cantidad de archivos que MinKNOW escribirá en una sola carpeta. De forma predeterminada, se establece en 4000, pero se puede reducir para que RAMPART se actualice con más frecuencia.

* Haga clic en 'Iniciar ejecución'.

* Supervise el progreso de la ejecución utilizando la interfaz MinKNOW

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- nCoV-2019 sequencing protocol v3 (LoCost) V.3 Josh Quick. University of Birmingham

ELABORADO CHYNTIA DIAZ	VERIFICADO MAGALY MARTINEZ	APROBADO EVA NARA	FECHA 14/06/2021
---------------------------	-------------------------------	----------------------	---------------------

