



Procedura sekwencjonowania genomów wirusów

SARS-CoV-2, wirusów grypy i RSV przygotowana w ramach projektu PLEpiSeq

dr n. med. Tomasz Wołkowicz



Współfinansowane przez
Unię Europejską

„Towards the National Platform for Genomic Surveillance” – Project 101113409 – PLEpiSeq
współfinansowany ze środków Unii Europejskiej w ramach EU4H Project Grants oraz Ministerstwa Zdrowia.

Wyrażone poglądy i opinie są jednak wyłącznie poglądami autora (autorów) i niekoniecznie odzwierciedlają przepisy Unii Europejskiej. Unia Europejska ani organ przyznający pomoc nie mogą być za nie pociągnięte do odpowiedzialności.

Spis Treści

Wstęp	2
Technologia sekwencjonowania	2
Izolacja DNA	Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.
Protokół Illumina	4
1. Tagmentacja genomowego DNA	16
2. Oczyszczanie	16
3. Amplifikacja bibliotek	18
4. Oczyszczanie bibliotek	20
5. Pomiary, pulowanie i przygotowanie bibliotek do sekwencjonowania	21
Protokół Nanopore	Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.
1. Tagmentacja i indeksowanie DNA	12
2. Oczyszczanie bibliotek	12
3. Nastawianie sekwencjonowania	13

Wstęp

Technologia sekwencjonowania

W poniższej procedurze skupiono się na 2 najczęściej stosowanych technologiach sekwencjonowania: z zastosowaniem urządzeń marki Illumina oraz sekwencjonowaniu nanoporowemu oferowanemu przez firmę Oxford Nanopore Technologies. Jesteśmy świadomi, że na rynku obecne są także inne platformy sekwencjonowania, takie jak PacBio czy IonTorrent, jednakże urządzenia te nie są powszechnie stosowane i nie są dostępne w laboratoriach NIZP PZH – PIB, stąd protokoły laboratoryjne nie mogły być odpowiednio przetestowane i zoptymalizowane do wykonywania odpowiednich analiz.

W przypadku rutynowego sekwencjonowania genomów wirusowych na potrzeby nadzoru epidemiologicznego, nie mówimy o sekwencjonowaniu pełnogenomowym *sensu stricto*, lecz o sekwencjonowaniu amplikonowym. Materiałem początkowym jest bowiem wymaz od pacjenta, z której to bezpośrednio izolowane są kwasy nukleinowe, nie zaś czysta hodowla patogenu, jak ma to miejsce na przykład w przypadku sekwencjonowania genomów bakterii. Stąd też wstępnym etapem pracy z takim materiałem jest specyficzna amplifikacja materiału genetycznego wirusa w reakcjach PCR, zaś powstałe fragmenty powinny zachodzić na siebie i pokrywać możliwie całościowo genom wirusa. Ze względu na potrzebę zachodzenia na siebie sąsiednich amplikonów, zazwyczaj stosuje się dwie pule starterów i wykonuje dwie odrębne reakcje PCR dla każdej próbki.

W przypadku sekwencjonowania genomów wirusowych wybór najlepiej dopasowanej technologii sekwencjonowania nie jest prosty i należy wziąć pod uwagę kilka istotnych aspektów. Po pierwsze genomy wirusowe są niewielkie i nie wymagają stosowania wysokoprzepustowych sekwenatorów. Konieczność projektowania skomplikowanych, wysoko-multipleksowych reakcji PCR promuje układy generujące mniejszą ilość fragmentów o dłuższej ilości, gdyż zarówno ułatwia to projektowanie reakcji, jak i zmniejsza prawdopodobieństwo oddziaływania starterów między sobą (np. powstawanie heterodupleksów). Stąd też, szczególnie przy sekwencjonowaniu ograniczonej ilości próbek, optymalne wydaje się stosowanie technologii sekwencjonowania nanoporowego. Zdolność tej technologii do generowania odczytów długości kilku kb (tysiący par zasad), dobrze koreluje z generowaniem optymalnej długości amplikonów. Dodatkowo elastyczność wynikająca z możliwości zakończenia reakcji sekwencjonowania i przepłukania flow-cell w przypadku uzyskania wystarczającej ilości danych sekwencyjnych sprawia, że w przypadku sekwencjonowania małych ilości małych genomów wirusowych stosowanie tej technologii wydaje się optymalne pod względem ekonomicznym. Dodatkowym atutem jest tu prostota i szybkość konstrukcji bibliotek do sekwencjonowania w przypadku zastosowania odczynników Rapid Barcoding Kit.

W przypadku technologii Illumina istnieje bardzo duża ilość zestawów odczynników oferowanych zarówno przez firmę Illumina, jak i niezależnych producentów. Warto więc przeanalizować dostępne zestawy i wybrać te, które optymalnie pasowałyby do potrzeb laboratorium.

Za stosowaniem technologii Illumina przemawia dużo wyższa jakość odczytów. Niestety dostępne odczynniki do sekwencjonowania i flow-celle generują bardzo konkretną ilość danych i nie ma możliwości zatrzymania reakcji i „oszczędzenia” flow-celli na kolejne sekwencjonowania. Stąd też istotne z ekonomicznego punktu widzenia wydaje się oszacowanie jaka ilość próbek wirusowych jest optymalna do sekwencjonowania w czasie jednego przebiegu sekwencjonowania.

Wartości Ct a wydajność sekwencjonowania

W przypadku sekwencjonowania genomów wirusowych z wymazów od pacjenta należy pamiętać, że na wymazówce znajdują się nie tylko cząstki wirusa, ale też inne wirusy i bakterie, a przede wszystkim nabłonki gospodarza. Stąd też wstępnym etapem do zakwalifikowania próbki do sekwencjonowania powinno być oszacowanie ilości wirusa np. w reakcji real-time PCR (najczęściej jest to spójne z wykonywanym testem real-time PCR na potrzeby diagnostyczne). Testy przeprowadzone w ramach projektu wykazały, że generowanie amplikonów z próbek wykazujących Ct na poziomie <20 pozwala na uzyskanie większości odczytów sekwencjonowania mapujących się do genomu danego wirusa. W przypadku próbek z Ct na poziomie ≈ 25 mniej więcej połowa odczytów sekwencjonowania mapuje się do genomu danego wirusa, zaś pozostałą część stanowią w większości odczyty z DNA ludzkiego. W przypadku próbek z Ct >30 nawet po rutynowej amplifikacji genomu wirusa we wstępnej reakcji PCR, wciąż większość odczytów mapuje się do genomu gospodarza, zaś tylko niewielki odsetek stanowią odczyty genomu wirusa. Przekłada się to na potrzebę uwzględniania wartości Ct przy szacowaniu niezbędnej ilości danych z sekwencjonowania by uzyskać żądane minimalne średnie pokrycie sekwencjonowania i w przypadku próbek o wysokim Ct może być potrzebne „głębsze” sekwencjonowanie. W efekcie sekwencjonowanie słabej jakości próbek, z niewielką ilością cząstek wirusa, nie ma uzasadnienia ekonomicznego.

Amplifikacja materiału genetycznego wirusów – synteza amplikonów do konstrukcji bibliotek

Amplifikacja genomu wirusa SARS-CoV-2

Wirus SARS-CoV-2 posiada jednosegmentowy genom RNA długości ≈ 30 kb.

Pojawianie się kolejnych wariantów wirusa i związana z tym zmienność kluczowych fragmentów genomu wymusza stałą aktualizację sekwencji starterów w protokołach. Do amplifikacji genomu wirusa zazwyczaj stosuje się startery wg protokołu ARTIC (obecnie w wersji v5.3.2), który generuje 99 amplikonów o średniej długości ≈ 400 nt, co sprawia, że jest idealnie dopasowany do sekwenatorów krótkoodczytowych, takich jest np. urządzenia Illumina, IonTorrent czy Aviti. Równolegle funkcjonuje protokół Midnight, który występuje w 3 wersjach różniących się ilością i długością generowanych amplikonów: 29 fragmentów po 1,2 kb, 23 fragmenty po 1,5 kb i 17 fragmentów po 2 kb. Ze względu na długość generowanych fragmentów, jest to protokół dobrze współpracujący z sekwenatorami długoodczytowymi, takimi jak Oxford Nanopore czy PacBio. Poza wspomnianymi kwestiami związanymi z samą reakcją PCR, zaletą generowania mniejszej ilości dłuższych fragmentów jest fakt, że mniejsza ilość miejsc wiązania starterów przekłada się na mniejszą wrażliwość na występowanie mutacji zmniejszających wydajność danego startera, bądź całkowicie go inaktywujących. Z drugiej strony, pojawienie się mutacji inaktywującej starter wiąże się z powstaniem długiej luki w uzyskanej sekwencji.

Ze względu na stale pojawiające się kolejne aktualizacje puli starterów (zarówno wg protokołu Artic, Midnight jak i wszystkich innych), w poniższym protokole nie wypisano listy starterów oraz ich sekwencji. W przypadku prowadzenia sekwencjonowania z zastosowaniem zakupionych zestawów odczynników do sekwencjonowania genomu wirusa SARS-CoV-2 lub zakupu puli starterów należy zwrócić uwagę na stosowaną wersję protokołu. Jest to szczególnie istotne w późniejszej analizie bioinformatycznej, gdzie informacja ta jest niezbędna dla prawidłowego zlokalizowania, zamaskowania i wycięcia sekwencji starterów podczas obróbki plików surowych i składania genomu wirusa.

Protokół Midnight 1200 wraz z odczynnikami Rapid Barcoding Kit wydają się optymalnym rozwiązaniem dla rutynowego i efektywnego kosztowo sekwencjonowania wirusa SARS-CoV-2 na potrzeby nadzoru epidemiologicznego. Protokół bazuje na odczynnikach New England Biolabs, które wraz z zestawem starterów można kupić w pakiecie Midnight Expansion lub w kompletnym zestawie odczynników COVID Mini V14.

1. Odwrotna transkrypcja:

a) Do probówki 0,2ml dodać:

- 2 μ l Lina Script RT SuperMix (LS RT)
- 8 μ l wyizolowanego RNA

b) Wstawić do termocyklera:

25°C	2 min
55°C	10 min
95°C	1 min
4°C	∞

2. Synteza ampikonów

a) Na każdą próbkę przygotować dwie probówki 0,2ml i opisać „A” i „B”

b) W probówkach wymieszać:

- 3,25 μ l wody
- 0,5 μ l odpowiedniej puli starterów (A lub B)
- 6,25 μ l Q5 HS Master Mix
- 2,5 μ l cDNA

c) Wstawić do termocyklera:

98°C	30 sec	x 35
98°C	15 sec	
61°C	2 min	
65°C	3 min	
4°C	∞	

Na tym etapie można płytkę przechowywać krótkoterminowo w lodówce do dalszych analiz.

Amplifikacja genomu wirusów grypy

Wirusy grypy posiadają genom RNA składający się z 8 osobnych segmentów o różnej długości:

- PB2 – 2,341 kb
- PB1 – 2,341 kb
- PA – 2,233 kb
- HA – 1,778 kb
- NP – 1,565 kb
- NA – 1,413 kb
- M – 1,027 kb
- NS – 0,890 kb

Do sekwencjonowania wirusów grypy A, B C i D stosuje się różne pule starterów. Pozwalają one na zamplifikowanie całych segmentów wirusa, co sprawia, że są one od razu gotowe do konstrukcji bibliotek w systemach długoodczytowych. W przypadku systemów krótkoodczytowych niezbędny jest dodatkowy etap fragmentacji produktów na odpowiedniej długości odcinki. W poniższym protokole przedstawiono listę starterów wraz z ich sekwencjami służące do amplifikacji wirusów grypy typu A i B, jako najistotniejsze z punktu widzenia zdolności do wywoływania zakażeń u ludzi.

- a) Zalecanymi odczynnikami do reakcji odwrotnej transkrypcji i konstrukcji amplikonów są odczynniki SuperScript III One-Step RT-PCR System z PlatinumTaq High Fidelity DNA Polymerase (Invitrogen, Thermo Fisher). Możliwe jest użycie innych odczynników, jak np. wspomniane wcześniej odczynniki New England Biolabs, jednak wymaga to wcześniejszego sprawdzenia protokołu i ewentualnie modyfikacji przebiegu reakcji dopasowanych do stosowanej chemii. W probówkach wymieszać:

- 12,5 µl 2x Reaction Mix
- 2 µl odpowiednich starterów
- 0,5 µl SuperScript RT/High Fidelity Enzyme Mix
- 19-21 µl wody (wolnej od RNaz)
- 4-6 µl izolatu RNA

b) Próbki wstawić do termocyklera:

45 °C	60 min	x 5 cykli
55 °C	30 min	
94 °C	2 min	
94 °C	20 sec	
	30 sec	
68 °C	3 min 30 sec	x 35 cykli
94 °C	20 sec	
58 °C	30 sec	
68 °C	3 min 30 sec	
68 °C	10 min	
4 °C	∞	

Na tym etapie można płytkę przechowywać krótkoterminowo w lodówce do dalszych analiz.

Stosowane startery i stosowane proporcje mieszania:

Grypa A	Starter (5'-)	Ilość /reakcję (z 10uM)
Uni12_Inf-1	GGGGGGAGCAAAGCAGG	0,4 µl
Uni12_Inf-3	GGGGGGAGCGAAAGCAGG	0,8 µl
Uni13_Inf-1	CGGGTTATTAGTAGAAACAAGG	1 µl

Grypa B *	Starter (5'-)	Proporcje mieszanki roboczej (z 10 µM)
B-PBs-UniF	GGGGGGAGCAGAAGCGGAGC	10 µl
B-PBs-UniR	CCGGGTATTAGTAGAAACACGAGC	10 µl
B-PA-UniF	GGGGGGAGCAGAAGCGGTGC	5 µl
B-PA-UniR	CCGGGTATTAGTAGAAACACGTGC	5 µl
B-HANA-UniF	GGGGGGAGCAGAAGCAGAGC	10 µl
B-HANA-UniR	CCGGGTATTAGTAGTAACAAGAGC	10 µl
B-NP-UniF	GGGGGGAGCAGAAGCACAGC	6 µl
B-NP-UniR	CCGGGTATTAGTAGAAACAACAGC	6 µl
B-M-Uni3F	GGGGGGAGCAGAAGCACGCACTT	3 µl
B-Mg-Uni3F	GGGGGGAGCAGAAGCAGGCACTT	3 µl
B-M-Uni3R	CCGGGTATTAGTAGAAACAACGCACTT	6 µl
B-NS-Uni3F	GGGGGGAGCAGAAGCAGAGGATT	5 µl
B-NS-Uni3R	CCGGGTATTAGTAGTAACAAGAGGATT	5 µl

* W przypadku starterów do grypy B nie zaleca się robienia zbyt dużej objętości miksu, by uniknąć wielokrotnego zamrażania i rozmrażania.

Amplifikacja genomu wirusa RSV

Genom wirusa RSV stanowi jednosegmentowa nić RNA średniej długości około 15 kb (tysięcy nukleotydów). Procedura syntezy amplikonów oparta została o procedurę rekomendowaną przez WHO, w której generowane są 4 zachodzące na siebie amplikony, długości odpowiednio: ~4 kb, ~3,584 kb, ~3,950 kb i ~4,374 kb. Każdy z amplikonów generowany jest w oddzielnej reakcji PCR, dlatego też w poniższej procedurze nie miesza się puli starterów. W procedurze opisano te same odczynniki Invitrogen / Thermo Fisher, co w protokole amplifikacji genomów wirusów grypy. W przypadku stosowania w laboratorium innych odczynników do odwrotnej transkrypcji oraz reakcji PCR możliwe jest zaadaptowanie protokołu pod inne odczynniki.

RSV	Nazwa oligonukleotydu	Sekwencja 5'→3'
Amplikon 1	RSV_v2_49F	GGCAAATAAGAATTTGATAAGTAC
	RSV_v2_4049R	TTTGATTGMAAAWCGTGTAGCTG
Amplikon 2	RSV_v2_3944F	GCCACARAGTCAATTYATAGTAG
	RSV_v2_7528R	TGTRACTGGTGTGYTTYTGG
Amplikon 3	RSV_Seg3_7215F	TGATGCATCAATATCTCAAGTCA
	RSV_Seg3_11165R	GRCCTATDCCTGCATACTC
Amplikon 4	RSV_Seg4_10959F	TGGACCATWGAAGCYATATCA
	RSV_Seg4_15333R	AGTGTCAAAACTAATRTCTCGT

- W 4 probówkach przygotować mieszaninę starterów, oddzielnie dla każdego z amplikonów. Na każdą próbkę przygotować po:
 - 1,25 µl starter F (stężenie 10µl)
 - 1,25 µl starter R (stężenie 10µl)
- Do mieszaniny starterów dodać po 5µl izolatu RNA
- Próbki wstawić do termocyklera w celu przeprowadzenia denaturacji i przyłączenia starterów:

95 °C	2 min
4 °C	2 min
4 °C	∞

- Na każdą reakcję przygotować mieszaninę enzymów zawierającą:
 - 12,5µl Platinum SuperFi RT-PCR Master Mix
 - 0,25µl SuperScript RT Mix

- 7,25µl wody wolnej od RNaz

e) Próbki wstawić do termocyklera i nastawić następujący program:

55 °C	10 min
98 °C	2 min
55 °C	10 sec
72 °C	2 min
72 °C	5 min
4 °C	∞

- f) (opcjonalnie) W celu weryfikacji skuteczności amplifikacji można przeprowadzić elektroforezę próbek w żelu agarozowym.
- g) (opcjonalnie) W celu bardziej równomiernego sekwencjonowania wszystkich amplikonów możliwe jest przeprowadzenie pomiaru ilości DNA dla każdego amplikonu i ważne połączenie wszystkich czterech amplikonów. Precyzyjne pomiary ilości DNA należy prowadzić z wykorzystaniem fluorymetru.

Produkty reakcji amplifikacji fragmentów genomów wirusów stanowią bezpośrednio materiał do konstrukcji bibliotek do sekwencjonowania. Dalszy protokół zależy więc od stosowanej platformy sekwencjonowania i używanych odczynników do konstrukcji bibliotek.

Protokół Nanopore

Poniższy protokół oparty jest o zestaw do konstrukcji bibliotek Rapid Barcoding Kit V14. Tak jak napisano we wstępie, technologia sekwencjonowania nanoporowego w przypadku sekwencjonowania relatywnie małych genomów wirusowych może być ciekawą alternatywą wobec innych technik sekwencjonowania. Dodatkową zaletą jest możliwość sekwencjonowania dłuższych ampikonów bez konieczności ich fragmentacji.

Zastosowanie odczytników Rapid Barcoding Kit V14 pozwala przygotować biblioteki i nastawić sekwencjonowanie < 1 godziny, bez widocznego spadku jakości generowanych odczytów czy wydajności sekwencjonowania. Zestaw ten, we wstępnym etapie konstrukcji bibliotek wykorzystuje opisaną we wcześniejszym protokole reakcję tagmentacji, co pozwoliło skrócić i uprościć całość protokołu. Ponadto, próbki po pierwszym etapie są już zindeksowane, co umożliwia ich połączenie i wspólne oczyszczanie w jednej probówce. Takie rozwiązanie pozwala znacząco ograniczyć zużycie plastików laboratoryjnych oraz zmniejsza pracochłonność procedury. Ubocznym skutkiem wstępnego etapu tagmentacji jest pewne pofragmentowanie DNA, co kłóci się z ideą długoodczytowego sekwencjonowania nanoporowego, jednak to delikatne pofragmentowanie nie wpływa znacząco na późniejszą analizę. Jedyną istotną wadą stosowania zestawu Rapid Barcoding Kit jest fakt pulowania próbek po pierwszym etapie, co może przekładać się na duże różnice w ilości uzyskiwanych danych dla poszczególnych próbek. Stąd też opcjonalnie można na wstępie kwantyfikować ilość DNA używanego do konstrukcji bibliotek.

Inną istotną kwestią podczas stosowania sekwencjonowania nanoporowego jest kwestia wydajności płytki do sekwencjonowania. Dużą zaletą sekwencjonowania nanoporowego jest możliwość wielokrotnego stosowania tej samej płytki. Pozwala to na sekwencjonowanie nawet pojedynczych próbek i kończenie procesu sekwencjonowania w momencie uzyskania odpowiedniej ilości danych do analiz. Po zakończeniu procesu sekwencjonowania płytkę do sekwencjonowania można przepłukać i zachować do ponownego użycia, do sekwencjonowania kolejnych próbek. Istotną wadą jest jednak zmienna ilość danych jaką można uzyskać z różnych płytek do sekwencjonowania, wynikająca ze zmiennej ilości początkowo aktywnych porów na matrycy oraz ich różnej żywotności.

Teoretycznie na matrycy płytki MinION znajduje się 512 kanałów, a w każdym z nich może być maksymalnie 4 pory, co daje łącznie maksymalną liczbę 2048 porów. W praktyce jednak, nowa płytka posiada przeciętnie 1200-1500 aktywnych porów. Jeśli liczba ta jest mniejsza niż 800, producent deklaruje nieodpłatne przesłanie nowej płytki. Niestety liczba aktywnych porów zmniejsza się również w trakcie sekwencjonowania, przy czym tempo tego spadku jest różne dla różnych płytek, a na jego tempo wpływa nie tylko jednostkowa właściwość danej płytki, jak również jakość sekwencjonowanej biblioteki, długość fragmentów czy ilość niezwiązanych

adapterów. W efekcie trudno jednoznacznie oszacować ilość uzyskanych danych, a tym samym np. ilość szczepów, które można maksymalnie sekwencjonować na pojedynczej płytce.

W przypadku prowadzenia niewielkiej ilości sekwencjonowań genomów wirusów ciekawą alternatywą jest stosowanie płytki reakcyjnej typu Flong. Jest to mniejsza wersja opisanej płytki MinION i wymaga zastosowanie specjalnego adaptera, jednak jest też istotnie tańsza. Posiada ona teoretycznie jedynie 128 kanałów, co w praktyce przekłada się zazwyczaj na około 60-80 kanałów aktywnych. Teoretycznie płytka typu Flong może generować ponad 2Gb danych. W przypadku stosowania płytki typu Flong należy mieć na uwadze mniejsze ilości odczynników podczas przygotowywania mieszaniny do sekwencjonowania (punkt 2, podpunkt s) oraz mniejszą objętość odczynników do płukania płytki reakcyjnej. Płytki typu Flong jest traktowana jako jednorazowa.



1. Tagmentacja i indeksowanie DNA

Przed rozpoczęciem konstruowania bibliotek zaleca się wyjęcie płytki do sekwencjonowania w celu jej ogrzania i sprawdzenia kondycji matrycy (Flow Cell Check)

Na tym etapie prowadzona jest tagmentacja DNA, czyli fragmentacja na mniejsze odcinki oraz dołączenie sekwencji adaptorowych wraz z indeksami.

- a) Przygotować 10 μ l próbki zawierającej 50ng DNA (uzupełnić do 10 μ l wodą).
- b) Dodać 1 μ l indeksu (barcode)
- c) Wstawić próbki do termobloku lub termocyklera
 - Pogram:
30°C - 2 min
80°C - 2 min
- d) Po inkubacji próbki schłodzić i zwirować.

2. Oczyszczanie bibliotek

Na tym etapie biblioteki są już oznakowane odpowiednimi indeksami oraz posiadają adaptory niezbędne w reakcji sekwencjonowania. Wszystkie etapy mieszania najlepiej wykonywać ręcznie albo przez przepipetowywanie.

- a) Połączyć wszystkie próbki w jednej probówce 1,5ml. Mieszaninę dobrze wymieszać i zwirować.
- b) Do probówki z próbkami **dodać równą objętość kulek AXP** (kulki muszą być dobrze wymieszane)
- c) **Inkubować** przez **5 min** w temp. pokojowej, delikatnie mieszając przy użyciu Hula-mixera.
- d) **Inkubować 5 min na statywie magnetycznym** do całkowitego wyklarowania roztworu
- e) Przygotować świeży 80% r-r Et-OH
- f) **Odciągnąć supernatant**
- g) **2 x przepłukać kulki 1,5ml 80% etanolu** nie uszkadzając peletu (płukanie prowadzić na statywie magnetycznym)
- h) Dokładnie usunąć etanol

- można lekko zwirować próbki, odstawić na statyw magnetyczny i usunąć resztki alkoholu cienkim tipsem
- i) **Przesuszyć pelet** przez 30 sekund (nie przesuszyć do momentu spękania peletu)
- j) Zdjąć próbkę ze statywu magnetycznego
- k) **Zawiesić pelet w 12µl Elution Buffer (EB)**
- l) **Inkubować 10 min** w temp. 35°C z delikatnym wytrząsaniem
 - Możliwa jest inkubacja w temperaturze pokojowej
- m) **Inkubować na statywie magnetycznym** do całkowitego wyklarowania roztworu
- n) W nowej próbówce typu DNA Lo-Bind (najlepiej 0,2ml) przygotować mieszaninę adaptera:
 - 1µl Rapid Adapter (RA)
 - 2, 3 µl Adapter Buffer (ADB)
- o) 1 µl przygotowanej mieszaniny adaptera przenieść do nowej próbówki (najlepiej 0,2ml)
- p) **Przenieść 11 µl eluatu** do próbówki zawierającej 1 µl adaptera
- q) Mieszaninę wymieszać i zwirować
- r) **Inkubować 5 min w temperaturze pokojowej**
- s) Do bibliotek dodać:
 - 37,5 µl Sequencing Buffer (SB)
 - 25,5 µl Library Beads (LIB)

Biblioteki są gotowe do naniesienia na przygotowaną do sekwencjonowania płytkę (patrz punkt 3). Biblioteki nanieść dopiero przed samym rozpoczęciem sekwencjonowania.

3. Nastawianie sekwencjonowania

Poniższe etapy płukania płytki do sekwencjonowania można prowadzić równolegle do końcowych etapów oczyszczania bibliotek.

- a) Ogrzaną do temperatury pokojowej płytkę umieścić w sekwenatorze
- b) Uruchomić program „Flow Cell Check” (czas trwania około 15 min)
- c) Przygotować mieszaninę do płukania. Końcowa objętość 1000 µl jest obliczona na wypłukanie jednej flow-celli.
 - 975 µl Flow Cell Flush
 - 25 µl Flow Cell Tether
- d) Mieszaninę wymieszać i zwirować



- e) Otworzyć pokrywę dołka „Priming Port” i pipetą z nałożonym tipsem na 1000 μ l usunąć powietrze z kanałów kręcąc pokrętką nastawy pipety **do momentu zaciągnięcia do tipsa odrobiny(!) żółtej cieczy** z flow-celli. Nie doprowadzać do opróżnienia płytki z cieczy, szczególnie uważając na stałe zanurzenie w cieczy matrycy flow-celli.
- f) Nanieść poprzez dołek „Priming Port” 800 μ l mieszaniny do płukania płytki do sekwencjonowania uważając, by nie wprowadzić na matrycę pęcherzyków powietrza.
 - Pipetę należy trzymać pionowo, by nie zaciągać zbędnego powietrza.
 - Po nabraniu 800 μ l mieszaniny warto zweryfikować, czy na końcu tipsa nie zebrało się powietrze. A takiej sytuacji usunąć powietrze przekręcając nastawę pipety.
 - Pipetowanie cieczy powinno się odbywać poprzez tips 1000 μ l zakotwiczony w dołku „Priming Port”.
- g) Odczekać 5 minut.
- h) Z „Priming Port” odciągnąć pipetą z nałożonym tipsem na 1000 μ l powietrze kręcąc pokrętką nastawy pipety do momentu zaciągnięcia do tipsa odrobiny(!) cieczy.
- i) Otworzyć pokrywę dołka „SpotOn”.
- j) Delikatnie nanieść pozostałe 200 μ l mieszaniny do płukania do dołka „Priming Port” uważając, by nie wprowadzić pęcherzyków powietrza.
 - W dołku „SpotOn” będzie pojawiać się ciecz, która grawitacyjnie ma wrócić do na matrycę płytki.
- k) Przepipetować mieszaninę bibliotek i całość nanieść na płytkę do sekwencjonowania poprzez dołek „SpotOn”.
- l) Zamknąć „SpotOn” oraz „Priming Port”.
- m) Uruchomić sekwencjonowanie wprowadzając odpowiednie parametry.
 - Warto zmienić ilość odczytów po których generowany jest plik FASTQ, by uzyskać najlepiej 1 plik zawierający wszystkie odczyty.

Przebieg sekwencjonowania można monitorować w czasie rzeczywistym. Sekwencjonowanie można zakończyć w momencie, kiedy najstarsza z sekwencjonowanych próbek osiągnie satysfakcjonujący poziom ilości danych. Na przykład, w przypadku sekwencjonowania wirusa SARS-CoV-2, przyjmując teoretyczną wielkość genomu za 30 kb (tysiący par zasad) i optymalne średnie pokrycie na poziomie 200x, ilość danych dla danej próbki powinna przekroczyć 6 Mb (licząc wyłącznie odczyty „pass”).

Protokół Illumina

Poniższy protokół oparty jest o zestaw do konstrukcji bibliotek Illumina DNA Prep. Na rynku dostępnych wiele innych zestawów do konstrukcji bibliotek na platformy Illumina, w tym również zestawów służących sekwencjonowaniu konkretnych genomów wirusowych. Również w przypadku odczynników marki Illumina można kupić zestawy dedykowane do sekwencjonowania poszczególnych wirusów, jednak w dużej mierze są one oparte o te same odczynniki do zestaw DNA Prep i są sprzedawane w zbliżonej cenie.

Pracochłonny protokół konstrukcji bibliotek Illumina może zostać automatyzowany, co wymaga posiadania dużej automatycznej stacji pipetującej z takimi polami jak: pole grzejne, statyw magnetyczny i wytrząsarka. Alternatywą są urządzenia zoptymalizowane do konstruowania bibliotek Illumina, jednakże takie urządzenia działają w oparciu o gotowe kartridże z odczynnikami i nie jest możliwa dalsza optymalizacja protokołu lub też wykorzystanie ich do innych badań laboratoryjnych. Optymalizując protokół na automatycznej stacji pipetującej należy zwrócić uwagę na większe objętości martwe, które mogą przekładać się na istotnie większe zapotrzebowanie na odczynniki, a tym samym ich większe straty. W przypadku długich protokołów zawierających etapy podgrzewania i inkubacji należy mieć na uwadze, że procesowane próbki są cały czas otwarte, co przekłada się na zwiększone parowanie, które przy małych objętościach może odgrywać istotne znaczenie uzyskiwanych stężeń reakcyjnych i w efekcie na efektywność procesów.

Poniższy protokół przeznaczony jest dla pipetowania ręcznego, uwzględnia bowiem możliwość precyzyjniejszego pipetowania małych objętości. Jednakże należy mieć na uwadze, że samo ręczne pipetowanie dużej ilości próbek, szczególnie z zastosowaniem pipety wielokanałowej, może być mniej powtarzalne i obarczone większym błędem pipetowania. W związku z powyższym optymalne wydaje się jednoczesne procesowanie do 16 próbek (max 24 próbki), by zmniejszyć prawdopodobieństwo niepowodzeń przy konstrukcji bibliotek.

1. Tagmentacja genomowego DNA

Na tym etapie prowadzona jest tagmentacja DNA, czyli fragmentacja na mniejsze odcinki oraz dołączenie sekwencji adaptorowych.

Odczynnik	Temp. przechowywania	Instrukcja
BLT	2°C do 8°C	Przenieść do temp. pokojowej. Zworteksować, aby dobrze zawiesić kulki magnetyczne. Nie wirować przed pipetowaniem.
TB1	-25°C do -15°C	Przenieść do temp. pokojowej. Zworteksować.

- Przygotować 8 μ l próbki zawierającej docelowo ≈ 50 ng DNA (próbkę dopełnić do 8 μ l wodą).
- Przygotować mieszaninę zawierającą (w przeliczeniu na 1 próbkę z $\approx 10\%$ zapasem):
 - 3 μ l BLT
 - 3 μ l TB1
- Bardzo dobrze zworteksować mieszaninę
- Dodać po 5,5 μ l mieszaniny do każdej próbki i przepipetować, by dokładnie wymieszać próbki
- Dokładnie zamknąć próbki
- Próbki inkubować przez 15 min w temp 55°C.
W przypadku prowadzenia inkubacji w termobloku należy wybrać opcję „Preheat lid” i ustawić na 100°C, zaś objętość próbki na 10 μ l)

2. Oczyszczanie

Ten krok ma na celu zatrzymanie procesu tagmentacji i oczyszczenie fragmentów DNA. Pocięte fragmenty DNA pozostają związane z kulkami magnetycznymi BLT, co umożliwia usunięcie z mieszaniny pozostałych cząstek DNA nie posiadających przyłączonego adaptera.

Odczynnik	Temp. przechowywania	Instrukcja
TSB	15°C do 30°C	Jeśli widoczne są precypitaty należy odczynnik ogrzać w 37°C do momentu ich rozpuszczenia
TWB	15°C do 30°C	Należy używać w temp. pokojowej

- b) Do każdej próbki dodać 3 µl TSB i przepipetować by dokładnie wymieszać próbkę.
- c) Dokładnie zamknąć próbki
- d) Próbki inkubować przez 15 min w temp 37°C.
W przypadku prowadzenia inkubacji w termobloku należy wybrać opcję „Preheat lid” i ustawić na 100°C, zaś objętość próbki na 15 µl)
- e) **Ustawić płytkę na statywie magnetycznym** i odczekać ok. 3 minuty aż całość kulek zostanie przyciągnięta przez magnes
- f) Usunąć supernatant
- g) **Płukanie (dwukrotne):**
 - Zdjąć płytkę ze statywu magnetycznego. Dodać powoli (w celu uniknięcia pienienia mieszaniny) 30 µl TWB **bezpośrednio na kulki magnetyczne**
 - Przepipetować powoli każdą próbkę aby dokładnie zawiesić kulki magnetyczne
 - **Ustawić płytkę na statywie magnetycznym** i odczekać ok. 3 minuty aż całość kulek zostanie przyciągnięta przez magnes
 - Usunąć supernatant
 - Powtórzyć płukanie jak powyżej
- h) Płytkę delikatnie zdjąć ze statywu magnetycznego. Dodać powoli (w celu uniknięcia pienienia mieszaniny) 25 µl TWB bezpośrednio na kulki magnetyczne
- i) Przepipetować powoli każdą próbkę aby dokładnie zawiesić kulki magnetyczne
- j) **Ustawić płytkę na statywie magnetycznym** i odczekać ok. 3 minuty aż całość kulek zostanie przyciągnięta przez magnes. Pozostawić na statywie do momentu amplifikacji bibliotek.

UWAGA: Przed kolejnym etapem wyjąć do rozmrożenia EPM (rozmrażanie na lodzie) oraz płytkę z indeksami.

3. Amplifikacja bibliotek

Pofragmentowane DNA wraz z adapterami jest w dalszym ciągu związane z kulkami BLT. W tym etapie następuje amplifikacja tych fragmentów z adapterami oraz dodanie na końcu odpowiednich indeksów umożliwiających późniejszą identyfikację próbki. Reakcja prowadzona jest w więc na kulkach BLT, zaś uzyskane produkty znajdują się w supernatancie.

Odczynnik	Temp. przechowywania	Instrukcja
EPM	-25°C do -15°C	Rozmrażać na lodzie. Wymieszać przez odwrócenie probówki. Zwirować.
Płytki z indeksami	-25°C do -15°C	Wyjąć i rozmrażać w temp. pokojowej. Płytkę z indeksami zwirować przed użyciem.

- Przygotować mieszaninę reakcyjną PCR, zawierającą na każdą próbkę:
 - 6,5 µl EPM
 - 6,5 µl wody jałowej wolnej od nukleaz
- Używając wielokanałowej pipety usunąć supernatant z płytki na statywie magnetycznym (piana/pęcherzyki pozostałe na ściankach nie wpływają niekorzystnie na jakość bibliotek)
- Płytkę delikatnie zdjąć ze statywu magnetycznego
- Dodać 12 µl mieszaniny reakcyjnej PCR bezpośrednio na kulki magnetyczne do każdego dołka
- Przepipetować dokładnie mieszaninę do momentu aż kulki magnetyczne zostaną dobrze zawieszone (Opcjonalnie: płytkę wytrząsać na wytrząsarce do mikroplatek przy 1600 rpm przez 1 min)
- Zakleić płytkę i zwirować przy 280 x g przez 3 sekundy
- Do próbek dodać po 3 µl kolejnego wolnego indeksu (UWAGA: zanotować który indeks znakuje którą próbkę)
- Ustawić pipetę na obj. 10 µl. Przepipetować 10 krotnie (dokładnie mieszaninę) do momentu aż kulki magnetyczne zostaną dobrze zawieszone (Opcjonalnie: zakleić płytkę i wytrząsać na wytrząsarce do mikroplatek przy 1600 rpm przez 1 min).
- Opcjonalnie: płytkę zwirować przy 280 x g przez 30 s.

j) Próbki wstawić do termocyklera

- Pogram:

68°C - 3 min

98°C - 3 min

(x) cykli:

98°C - 45 s

62°C - 30s

68°C - 2 min

68°C - 1 min

Hold na 10°C

Liczba cykli zależy od ilości i jakości użytego DNA. Zazwyczaj ustawia się 5 lub 6 cykli.

Na tym etapie można przerwać procedurę przygotowania bibliotek i przechowywać próbki w temperaturze 2-8°C do 3 dni.

4. Oczyszczanie bibliotek

Na tym etapie produkty amplifikacji (biblioteki) znajdują się w supernatancie. Docelowe fragmenty bibliotek przeznaczone do sekwencjonowania na platformie Illumina powinny być stosunkowo krótkie. Dlatego we wczesnych etapach oczyszczania usuwa się dłuższe cząsteczki DNA (poprzez oczyszczanie z użyciem rozcieńczonych kulek magnetycznych), natomiast dopiero w końcowym etapie właściwe fragmenty bibliotek są wiązane do kulek i następnie płukane.

Odczynnik	Temp. przechowywania	Instrukcja
IPB	2°C do 8°C	Wyjąć odczynnik IPB i ogrzewać w temp. pokojowej przez min. 30 min. Kulki IPB mogą być przechowywane w temperaturze pokojowej. Przed użyciem należy je bardzo dobrze wymieszać.
RSB	-25°C do -15°C	Wyjąć RSB. Rozmrażać na lodzie. Przed użyciem zworteksować.

- Zwirować płytkę, następnie umieścić ją na statywie magnetycznym i odczekać ok. 5 minut, aż wszystkie kulki zostaną przyciągnięte przez magnes
- Przenieść możliwie całość (15 µl) supernatantu do nowych, czystych dołków. **Nie wylewać supernatantu!**
- Dobrze wymieszać kulki IPB
- Przygotować rozcieńczone kulki IPB, mieszając 14 µl wody z 16 µl kulek IPB na każdą próbkę
- Do każdego dołka z supernatantem dodać 28 µl mieszaniny rozcieńczonych kulek
- Wymieszać przez pipetowanie (10 krotne)
- Inkubować 5 min
- Ustawić płytkę na statywie magnetycznym i odczekać ok. 5 minut aż całość kulek zostanie przyciągnięta przez magnes
- W czasie inkubacji zworteksować ponownie bardzo dokładnie IPB i odpipetować po 5 µl IPB do nowych czystych dołków
- Przenieść po 42 µl supernatantu do dołków zawierających 5 µl IPB
- Zdjąć płytkę ze statywu magnetycznego
- Wymieszać przez pipetowanie (10 krotne) próbki
- Inkubować 5 min

- n) Umieścić płytkę na statywie magnetycznym i inkubować przez ok. 5 minut, aż wszystkie kulki zostaną przyciągnięte przez magnes
- o) Ostrożnie usunąć supernatant, nie naruszając peletu kulek magnetycznych
- p) Dodać 80 µl świeżego 80% etanolu, nanosząc go po przeciwnej ścianie studzienki niż znajduje się pelet kulek
- q) Inkubować ok. 30 sekund
- r) Odciągnąć całość alkoholu
- s) Powtórzyć płukanie 80 % alkoholem (obj. 80µl)
- t) Dokładnie odciągnąć resztki alkoholu. Płytkę zostawić do przeschnięcia w celu odparowania resztek alkoholu (do 5 min.)
- u) Płytkę delikatnie zdjąć ze statywu magnetycznego
- v) Osad zawiesić w 13 µl RSB
- w) Całość wymieszać (można przepipetować)
- x) Inkubować 2 min
- y) Płytkę ustawić na statywie magnetycznym i inkubować (ok. 2 min) aż całość kulek zostanie przyciągnięta przez magnes
- z) Delikatnie przenieść 12 µl supernatantu do nowej probówki.

Biblioteki mogą być przechowywane do sekwencjonowania krótkoterminowo w lodówce, bądź w zamroźniku (-25°C do -15°C) do 30 dni.

5. Pomiary, pulowanie i przygotowanie bibliotek do sekwencjonowania

Pomiary ilości DNA prowadzić z użyciem fluorymetru przyjmując za użyteczne do sekwencjonowania próbki, posiadające > 2 ng/µl DNA. Pomiary z użyciem TapeStation czy BioAnalyzer'a są wskazane przed producenta, jednakże w kontekście sekwencjonowań mikrobiologicznych wydają się stanowić kosztowny i pracochłonny dodatkowy etap. Jeśli tego typu urządzenie jest na wyposażeniu laboratorium racjonalnym wydaje się weryfikacja tylko losowych próbek, bądź sprawdzanie próbek o niskiej ilości DNA.

Obliczyć stężenie molowe próbek używając poniższego wzoru:

$$\frac{X \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}} \times 10^6}{660 \frac{\text{ng}}{\text{mol}} \times \text{średnia wielkość biblioteki (bp)}} = \text{Molarność (nM)}$$

Przyjąć średnią długość biblioteki równą 600 bp (w przypadku innych odczynników od konstrukcji bibliotek może to być inna wartość, która powinna być podana w instrukcji producenta zestawu).

W zależności od posiadanego sekwenatora może być potrzebne rozcieńczenie bibliotek do stężenie 4 nM bądź 2 nM. Do rozcieńczania bibliotek stosujemy bufor RSB.

Rozcieńczone biblioteki, które będą sekwencjonowane w czasie jednej reakcji, należy połączyć w jedną mieszaninę (pulowanie). W przypadku pulowania bibliotek uzyskanych dla różnych wirusów warto uwzględnić teoretyczne wielkości genomów i pulować biblioteki w odpowiedniej proporcji, by uzyskać w efekcie odpowiednie proporcje ilości danych z sekwencjonowania. Na przykład, łącząc biblioteki uzyskane dla gatunków wirusów, takich jak SARS-CoV-2, wirusy grypy czy RSV można zastosować proporcję 30 : 10 : 15 (szacując wielkości genomów odpowiednio na 30 kb, 10 kb i 15 kb).

Ilość bibliotek, które można połączyć w jednej mieszaninie zależy od posiadanego modelu sekwenatora oraz ilości danych, jakie można uzyskać z danej chemii do sekwencjonowania. Optymalne sekwencjonowanie genomów bakteryjnych zakłada uzyskanie średniego pokrycia genomu na poziomie >50x. W celu oszacowania ilości próbek należy zastosować poniższy wzór:

$$\text{maksymalna ilość próbek} = \frac{\text{output}}{\text{wielkość genomu} * \text{minimalne średnie pokrycie}}$$

Dalsze kroki wykonywać zgodnie z instrukcją producenta posiadanego aparatu i stosowanej chemii do sekwencjonowania.